

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Veterinarie

Ciclo XXIX

Settore Concorsuale: 07/H4

Settore Scientifico Disciplinare: VET-08

TITOLO TESI

**IL POTENZIALE ANGIOGENICO NEL CARCINOMA A
CELLULE TRANSIZIONALI VESCICALE DEL CANE**

Presentata da: Dr Raimondo Tornago

Coordinatore Dottorato

Supervisore

Chiar.mo Prof. Arcangelo Gentile

Chiar.mo Prof Fabio Gentilini

Esame finale anno 2018

SOMMARIO

Introduzione	3
1. Capitolo 1 - Storia dell'angiogenesi	6
2. Capitolo 2 - Vasculogenesi	20
3. Capitolo 3 - Angiogenesi	24
4. Capitolo 4 - Meccanismi angiogenetici	30
5. Capitolo 5 - Metalloproteinasasi	41
6. Capitolo 6 – <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>	78
7. Capitolo 7 - Carcinoma a cellule transizionali vescicale	95
8. Capitolo 8 - Materiali & metodi e risultati	122
9. Capitolo 9 - Discussione e conclusioni	141
10. Bibliografia	150

INTRODUZIONE

L'oncologia veterinaria, sia medica che chirurgica, è una delle discipline scientifiche che più si è giovata di importanti progressi negli ultimi 10 anni.

Attualmente l'interesse, oltre ad essere rivolto al benessere degli animali d'affezione, si è spostato anche sulla possibilità di utilizzare il modello animale come importante contributo allo studio della patologia neoplastica dell'uomo. In particolare il cane si è dimostrato essere un importante modello di patologia comparata, condividendo con l'uomo meccanismi eziopatogenetici e possibili risvolti terapeutici. Appare quasi superfluo ricordare che carcinoma mammario, linfoma e carcinoma a cellule transizionale vescicale siano ormai modelli ampiamente accettati di studio in oncologia comparata.

Ciò non stupisce, considerando quali e quanti punti in comune abbiano il genoma umano e canino, quest'ultimo unica specie a fregiarsi di una mappatura completa nelle specie non umane.

Ancora il ruolo di sentinella ambientale svolto dal cane è ormai dato attentamente monitorato dai centri di ricerca oncologica.

Negli ultimi anni uno dei più importanti target di studio oncologico in medicina umana è stato la comprensione dei meccanismi che permettono ad una neoplasia di alimentarsi ed acquisire il fenotipo metastatico. Dobbiamo al medico americano Judah Folkmann l'intuizione che tale duplice funzione sia intimamente correlata alla capacità stessa del tumore di crearsi una propria rete vascolare indipendente da quella dell'organismo che la ospita. Tale capacità veniva definita come "angiogenesi neoplastica".

Gran parte degli sforzi della ricerca medica oncologica umana sono stati rivolti, oltre che alla comprensione dei meccanismi che ne guidano il processo, al contrasto di tale fenomeno, portando a risultati di notevole impatto scientifico-terapeutico.

Non possiamo non ricordare come ad oggi il Bevacizumab (Avastatin), anticorpo monoclonale ad azione anti Vegf (vascular endothelial growth factor), sia ormai terapia consolidata in patologie di devastante impatto sulla vita delle persone, come carcinoma metastatico di colon/retto (CRC), carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC), Carcinoma renale avanzato e/o metastatico (mRCC), carcinoma ovarico e carcinoma mammario metastatico.

Oltre all' utilizzo di anticorpi monoclonali, la possibilità di somministrare diversi agenti farmacologici non più al loro dosaggio massimo tollerato, bensì a dosi estremamente ridotte ma in maniera continuativa (chemioterapia metronomica) ha dimostrato di possedere importanti risvolti terapeutici proprio in virtù della capacità di contrasto alla stessa angiogenesi neoplastica.

Questa modalità di somministrazione, e ne sono testimoni i numerosi studi pubblicati negli ultimi anni, ha riscosso notevole successo anche in medicina veterinaria. Le ragioni di tale successo sono da ricercarsi, oltre che nei favorevoli risultati clinici ottenuti, dal basso impatto economico ed della eccellente qualità di vita che ne godono i nostri pazienti in terapia.

Particolare attenzione è stata da noi rivolta ad uno studio del 2013, dove Shrepp *et al* mettevano in evidenza come la somministrazione di farmaci in modalità metronomica rappresentasse una valida opzione terapeutica per il carcinoma a cellule transizionali della vescica del cane (TCC).

Prendendo spunto da questo articolo, oltre che da altri che hanno posto al centro dell'attenzione il potenziale angiogenico di questa neoplasia, abbiamo voluto verificare se esistesse la possibilità di individuare e quantificare tale espressione in una popolazione di cani affetti da carcinoma a cellule transizionali vescicali (TCC) nel cane e di comparare tali valori con una popolazione di cani clinicamente sani

Ricordiamo infatti che il TCC, la più comune neoplasia maligna vescicale in questa specie, cane rappresenta spesso una sfida diagnostica in ragione della controindicazione ad eseguire agoaspirati transvescicali (a causa del rischi di disseminazione neoplastica attraverso il tragitto degli aghi). Per questo motivo spesso incontriamo notevoli difficoltà diagnostiche, dovendo per lo più ricorrere a metodiche di indagine più invasive (es cistoscopia) e di non semplice realizzo, specie in pazienti di taglie ridotte.

Il nostro studio è mirato ad evidenziare se questa neoplasia possiede dei marcatori urinari in grado di dimostrare la componente neo-angiogenica e se questi possano ulteriormente confermare la possibilità di continuare, e magari ampliare, le possibilità terapeutiche.

Il potenziale angiogenico è stato già indagato in istologia tramite metodiche immunoistochimiche e non. Tuttavia ancora poco è stato fatto circa la possibilità di esplorare tale potenziale avvalendosi di esami eseguiti direttamente sul campione urinario, rendendo di fatto estremamente più agevole l'analisi.

La possibilità poi di avvalorare l'ipotesi angiogenica in tale neoplasia, costituirebbe un razionale di terapia all'applicazione di regimi terapeutici in modalità metronomica, aprendo importanti risvolti nella pratica oncologica clinica veterinaria.

CAPITOLO UNO

1.1.Storia dell'angiogenesi

Per riuscire a comprendere l'importanza del ruolo dell'angiogenesi nella storia della medicina moderna, occorre risalire ai primi tentativi di raffigurazione di un cuore (rappresentato come un organo trafitto da una freccia) che si rinvennero già all'interno di caverne preistoriche (Natale et al., 2017).

Tuttavia il primo vero tentativo di identificare nel cuore l'elemento centrale di un sistema di circolazione si verifica solo successivamente nei primi veri trattati di medicina, ossia nei papiri dell'antico Egitto. Tra essi citiamo il papiro di Edwin Smith, il più antico trattato di medicina a nostra conoscenza, il papiro di Ebers, il grande papiro di Berlino e il papiro di Brugsh, rinvenuti in tempi diversi nel passato. In particolare nei 100 fogli del papiro di Ebers, arrivato ai giorni nostri nella sua interezza, per la prima volta si parla di misurazione del cuore attraverso le sue pulsazioni, generate dalla sua contrazione. Sempre in questo documento, oltre al riconoscimento per la prima volta di una malattia tumorale e al primo tentativo di indicarne dei metodi per la sua eliminazione, riconosciamo la descrizione di un tipo di “vaso tumorale”, il quale si ipotizzava originare dalla ferita di un vaso sanguigno. (Natale et al., 2017; Willerson e Teaff, 1996).



Figura 1 Papiro di Ebers, fonte *National Library of medicine*

Anche la medicina cinese, come ampiamente descritto nel trattato “*Huang Ti Nei Ching Sur Wen*”, ha riconosciuto nel cuore il ruolo di controllore centrale del flusso del sangue. In particolare, in questo trattato datato intorno al 2660 A.C., vengono identificati ben 28 diversi tipi di “*impulso ematico*”. Questi diversi tipi di impulso sono poi stati utilizzati come le basi per la costituzione della pratica dell’agopuntura (Natale et al., 2017).

Nella medicina indiana, esercita in quell’ epoca esclusivamente dai bramini (membri della casta sacerdotale), rinveniamo un contributo alla comprensione dei meccanismi alla base della circolazione sanguigna. Nel trattato “*Vagadasastir*” si parla di un sistema composto da migliaia di vasi, questi visti come” tubi” che permettono lo scambio di gas, il cui conflitto tra essi dava luogo alle più disparate malattie (Natale et al., 2017).

Nell’ antica Grecia le prime osservazioni sull’ anatomia e la fisiologia dei vasi sono state a noi tramandate attraverso i poeti Omero ed Esiodo. Le loro deduzioni furono il frutto dell’osservazione delle

ferite procurate ai soldati durante la guerra di Troia (Loukas et al., 2007; Natale et al., 2017).

Sempre nell' antica Grecia riconosciamo per la prima volta la distinzione tra arterie e vene. Tale distinzione fu fatta da Almeone di Crotone, medico e filosofo del V secolo a.c.. Tuttavia è solo con il più noto Aristotele che viene definito il ruolo di connessione vigente tra il cuore ed i vasi sanguigni. Inoltre è sempre Aristotele ad osservare il rapido sviluppo dei vasi sanguigni che, a partire dal cuore, si verifica durante la vita embrionale (Natale et al., 2017).

Sempre ad un rappresentante del popolo ellenico, Ippocrate, dobbiamo la prima descrizione dello sviluppo dei vasi sanguigni intorno ad un tumore. Fu esso infatti ad utilizzarne il paragone con le chele di un granchio e a coniare il termine di "*Karkinoma*" (Weiss L, 2000).

Le osservazioni di Ippocrate furono poi riprese da Galeno che, circa nel 200 a.c., descrive, nel suo trattato "*Methodus medendi*", i vasi sanguigni che si generano da un tumore. Egli descrive questi ultimi generarsi da un processo infiammatorio e distinguersi da questi, per maggior "*durezza*" e per un colore più scuro ma presentarsi meno caldi al tatto (Natale et al., 2017).

Circa un secolo dopo è la volta della medicina islamica a dare un suo importante contributo alla comprensione del sistema cardiovascolare. Tra i più importanti esponenti della scuola medica islamica riportiamo Avicenna, meglio conosciuto con il suo nome arabo di Ibn Sina (autore questo del fondamentale libro "*The canon of medicine*"), Ibn Al-Nafis e Ibn al- Quff. In particolare dobbiamo alla scuola araba, oltre alla descrizione del sistema circolatorio encefalico, la descrizione delle contrazioni ventricolari, lo studio della circolazione polmonare, la teorizzazione (ne era ancora preclusa, per ragioni tecniche, la diretta

osservazione) di un sistema di connessione tra le arterie e le vene, ossia si inizia a parlare di una "rete capillare" (El Maghawry et al., 2014; Natale et al., 2017) .



Figura 2: "the canon of medicine", Avicenna; from www.muslimheritage.com

Durante il periodo rinascimentale è la figura geniale di Leonardo da Vinci (1452-1519) a contribuire alla comprensione della materia. Fu infatti il Da Vinci, attraverso studi di dissezione anatomica eseguiti su cadaveri di criminali, a descrivere le connessioni esistenti tra i vasi. Anche se allo stesso fu preclusa la diretta osservazione, descrisse come capillari, arteriole e venule quelle interconnessioni vascolari (Pearce, 2007; Natale et al., 2017).

Nel XVI secolo risalgono le opere di Andrea Vesalio (1514-1564),

considerato il padre della moderna anatomia , e del cremonese Realdo Colombo (1516-1559).

Il primo, nel suo trattato “*De humani corporis fabrica*”, portava in evidenza la presenza delle valvole venose e, in contrasto con la teoria ampiamente accettata di Galeno, correggeva l’assunto che tutti i grossi vasi ematici che irroravano il corpo fossero tutti generati dal fegato, il secondo invece ipotizzò che il sangue venoso di provenienza del ventricolo destro, andasse direttamente nei polmoni allo scopo di arricchirsi di ossigeno (Khan et al., 2004; Natale et al., 2017).



Figura 3: De humani corporis fabrica libri Septem (fonte: www.nlm.nih.gov)

Sempre verso la fine del XVI secolo compare per la prima volta il termine “circolazione”, utilizzato da Andrea Cesalpino (1524-1603). Tale termine viene utilizzato proprio nella descrizione del distretto vascolare polmonare (Prioreshi 2004).

Furono proprio le osservazioni del Cesalpino, nato in Arezzo e allievo

del Realdo Colombo, a precedere le teorie di William Harvey (1578-1657) che, sebbene anche esso non disponesse dei mezzi tecnici per osservazioni microscopiche, dimostrò la corretta circolazione del sangue nel corpo umano ed identificò nel muscolo cardiaco la pompa in grado di generare e mantenere la circolazione ematica. Gli studi di William Harvey sono raccolti nella sua opera “*De motu cordis*”, nel 1628 (Natale et al., 2017).

Tuttavia è Marcello Malpighi (1628-1694) ad usufruire dell’invenzione, da parte degli olandesi Hans e Zacharias Janssen alla fine del XVI secolo, del primo microscopio ottico. Fu infatti grazie a questo fondamentale strumento che il nostro Malpighi poté’ osservare direttamente quello che fino ad allora si era solo potuto teorizzare, ossia la rete dei piccoli capillari nei polmoni di una rana, aggiungendo il dato mancante agli studi di Harvey. Ancora le sue osservazioni si sono poi focalizzate sui capillari componenti il glomerulo renale che ha dettagliatamente descritto nella la circolazione allanto-corion, dove avvengono gli scambi nutritizi nell’ embrione del pulcino (Natale et al, 2017).

Venendo al termine “angiogenesi”, esso deriva dalle parole greche angeion (vasi) e genesi (nascita) e sta ad indicare la crescita di nuovi vasi da un preesistente letto vascolare in risposta a stimoli fisici e/o meccanici (Natale et al, 2017).

Proprio Il termine “*angiogenesi*” è stato utilizzato per la prima volta nel 1787 da un chirurgo inglese John Hunter (1728-1793) (Folkmann, 2008).

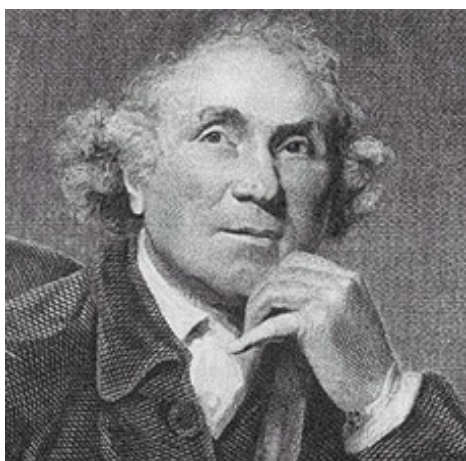


Figura 4: *Sir J. Hunter, dettaglio, fonte National Portrait Gallery*

Recentemente, Lenzi et al, in uno studio del 2016, hanno messo in evidenza come il termine “angiogenesi” non risulti in nessuna delle opere tramandate a noi dal medico inglese. Tuttavia non si può non riconoscerne a Lui il merito di aver ampiamente descritto per primo tale meccanismo. Da un punto di vista storico il termine “angiogenesi” compare per la primissima volta nel 1900, allorché Flint descrive la vascolarizzazione della ghiandola surrenale.

Nonostante queste giuste considerazioni, gli autori riconoscono, come la letteratura medica mondiale, la paternità del termine “angiogenesi “, al chirurgo inglese. (Lenzi et al 2016, Folkmann, 2008).

Nel 1865 Vierchow, il padre dell’anatomia patologica, focalizzò i suoi studi proprio sull’ enorme massa di vasi sanguigni che un tumore era in grado di esprimere (Ribatti et al, 1999).

Già nel 1907, tramite i lavori di Goldmann, si trova traccia del primo tentativo di visualizzare la rete vascolare, sia nell’ uomo che negli animali, tramite iniezioni intra-arteriose, di bismuto in olio. Proprio grazie a questi studi morfologici si mise’ in luce la capacità di differenziare visivamente una rete vascolare fisiologica da una

neoplastica, quest' ultima caratterizzata da vasi a crescita caotica.

Nella prima parte del 900, proprio in virtu' delle osservazioni di morfologia vascolare, sia nell' uomo che negli animali, si tentava di dare delle possibili risposte circa la distinzione tra una neoplasia benigna o maligna. Inoltre iniziavano le prime osservazioni dirette di emboli neoplastici all' interno di vasi tumorali (Ribatti et al, 1999; Folkmann, 2008).

Verso la fine degli anni 30 e l'inizio del 1940, attraverso gli esperimenti di Ide et al e Algire e Chalkley, si inizia a focalizzare l'attenzione, utilizzando anche maniera brillante delle camere trasparenti dotate di pareti costituite da filtri micro-porati, impiantate nella cute di gatti, come la crescita dei vasi tumorali sia intrinsecamente connessa al rilascio di fattori di stimolazione da parte del tumore stesso . Tuttavia in questi studi non si è mai arrivati all' identificazione di questi fattori, ipotizzando solo essere dei prodotti del metabolismo neoplastico o prodotti dall'infiammazione o dall' acido lattico o, ancora, da condizioni di ipossia. Possiamo infatti affermare che fino agli inizi degli anni 70 si riconoscevano in aspecifici fattori prodotti da cellule tumorali morenti, la capacità di generare vasi (Ribatti et al, 1999), Folkmann, 2008).

E' dagli inizi degli anni 60 che, grazie agli studi di Becker e Folkman, utilizzando soluzioni di emoglobina (in quegli anni si cercava di utilizzarle come sostituti di una trasfusione ematica) perfusi all' interno del ramo arterioso della tiroide del cane, isolata in una camera trasparente, che la rete vascolare viene indagata nella sua morfologia più fine. Inoltre venivano poi impiantate nell'organo delle linee cellulari di melanoma di topo allo scopo di osservarne il comportamento. L'osservazione più importante fu data dal fatto che le

linee cellulari neoplastico non crescevano più di 1 mm³ negli organi isolati, mentre, le stesse linee cellulari, impiantate in organi perfusi, aumentavano di oltre 1000 volte il volume neoplastico. Questa differenza suggerì come l'assenza di rete vascolare, portasse all'arresto della crescita neoplastica a dimensioni estremamente ridotte, circa 1 mm³. La crescita della massa tumorale fino ai 2 mm di diametro è infatti sostenuta da diffusione passiva di ossigeno e nutrienti (Folkman, 2008).

Tuttavia è solo nel 1971 che si arrivò, grazie al gruppo di ricerca di Folkman, ad isolare il primo fattore angiogenico. A questo risultato si giunse utilizzando un omogeneizzato proveniente da una linea cellulare di neoplasia mammaria di ratto (Walker 256). Una sua frazione di 10000 Da mostrava spiccate doti pro-angiogeniche. Dopo adeguato trattamento di purificazione si è arrivati all'isolamento di un fattore, chiamato poi "*tumor angiogenesis factor*" o fattore "TAF". Sempre dalla stessa linea cellulare sono poi stati isolati altri fattori di crescita vascolare, tutti in grado di indurre una risposta vasoproliferativa una volta iniettati nella cornea di coniglio, nella membrana corioallantoidea del pulcino o in colture endoteliali cellulari. Inoltre, come descritto da Folkman nel lavoro "*Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis.*" del 1971, si individua nell'angiogenesi un futuro e promettente target anti-neoplastico (Folkman et al; 1971).

Si devono attendere gli inizi degli anni 80 per riuscire a isolare e purificare tali fattori in grado di stimolare l'angiogenesi. Furono infatti due ricercatori del laboratorio di Folkman a Boston, Yuen Shing e Michael Klagsbrun, ad isolare e purificare sia il *basic fibroblast growth factor* (FGF-2) che il *Vascular endothelial growth*

factor, utilizzando una tecnica di cromatografica (Ribatti et al, 1999; Folkman 2008).

Successivamente, il gruppo di Esch, ottenne il sequenziamento aminoacidico del FGF-2 lavorando sulla molecola estratta dalla ghiandola pituitaria di bovino (Ribatti et al, 1999).

Nel 1983 una seconda molecola angiogenica prodotta dalla neoplasia, il *vascular permeability factor* (VPF) viene scoperta e purificata da Senger e Dvorak (Ribatti et al, 1999; Folkmann 2008).

Successivamente, nel 1989, l'italiano Napoleone Ferrara scoprì grazie al completo sequenziamento aminoacidico del VEGF, che VEGF e VPF in realtà erano la stessa molecola (Ferrara and Henzel, 1989).

Parallelamente all'attività di ricerca focalizzata all'individuazione di molecole pro-angiogeniche, i ricercatori puntarono la loro attenzione verso l'individuazione di molecole in grado di inibirne tale attività. Lo studio delle molecole anti-angiogeniche da un lato gettava le basi per lo sviluppo di terapie mirate e dall'altro continuava a portare continue evidenze del ruolo fondamentale dell'angiogenesi nel processo neoplastico (Folkmann, 2008).

In particolare furono Dvorak e Auerbach a dimostrare, in vitro e su modelli animali, l'attività anti-angiogenica della prima molecola con proprietà anti-angiogeniche, ossia l'interferone alfa (Folkman, 2008).

Lo studio di tali molecole non occupò solo ricercatori nell'ambito della patologia oncologica, bensì il fenomeno angiogenetico risultò di notevole interesse anche in altre branche della medicina, in particolare la pneumologia, dove patologie come l'emangiomatosi polmonare furono materia di studio per riuscire ad individuare nel blocco della proliferazione vasale una possibile via terapeutica (Folkmann, 2008).

Sempre il gruppo di Harvard (Boston), guidato da Judah Folkman, portò all'individuazione, in un lasso di tempo che va dal 1980 al 2005, di ben 12 molecole dotate di attività anti-angiogenica (Folkman, 2008).

Fino al 1980 non si conosceva l'esistenza di nessuna molecola in grado di esercitare un diretto effetto anti angiogenico. La prima molecola fu scoperta analizzando la cartilagine di coniglio neonato. Infatti questo tessuto avascolare mostra una innata resistenza all'invasione di vasi provenienti da parte di diverse neoplasie (Ribatti, 2008).

Delle 12 molecole individuate nel laboratorio di Harvard (Figura 5), l'interferone alfa, come accennato in precedenza, non mostrò solo interesse nel campo oncologico, bensì diventò interesse di studio nel campo della terapia dell'angiomatosi, sia polmonare che del cervello e del fegato. Ancora divenne interessante argomento di studio per la terapia dell'angioblastoma. (Ribatti, 2008).

1980. Interferon alpha-beta
1982. Platelet factor 4/ protamine
1985. Angiostatic steroids
1990. Fumagillin
1994. Angiostatin
1994. Thalidomide
1994. 2-methoxyestradiol
1997. Endostatin
1999. Cleaved antithrombin III
2002. 3-Aminothalidomide
2003. DBF-maf
2005. Caplostatin

Figura 5: *elenco cronologico delle molecole a proprietà antiangiogenica scoperte e testate nei laboratori di Harvard (da Folkman, 2008)*

Delle sostanze elencate in tabella, angiostatina ed endostatina, mostrarono un iniziale grosso interesse in virtù dell'osservazione che la rimozione della neoplasia primaria spesso portava ad un rapido sviluppo delle metastasi. Secondo l'ipotesi di Folkman ciò si verificava in quanto durante la crescita di una neoplasia si assisteva ad una produzione sia di fattori pro che anti-angiogenenici. Tuttavia se all'interno della massa neoplastica si assisteva ad una quota maggiore di fattori inibenti, tale rapporto risultava invertito se si andava ad analizzare nell'apparato circolatorio nel suo complesso.

Folkman ipotizzò quindi che rapidi cambiamenti di tale rapporto potessero essere un fattore in grado di alterare tale equilibrio. Tale osservazione fu poi confermata andando ad utilizzare come modello di studio la linea cellulare del carcinoma polmonare di Lewis. Dagli studi sperimentali si notava che entro 5 giorni dalla rimozione del tumore primario, le metastasi crescevano esponenzialmente, e contemporaneamente si assisteva ad un incremento dei fattori pro angiogenici ed ad un crollo dei fattori inibenti. Tali fattori furono poi identificati come angiostatina e, successivamente, anche come endostatina (Ribatti, 2008).

Già nel decennio successivo alle pubblicazioni di Folkman, si faceva strada il cosiddetto concetto di "Switch angiogenico", il quale può essere definito come la conversione della neoplasia da uno stato quiescente o meglio di "dormienza", nel quale prevalgono di fatto i fattori inibenti l'angiogenesi, ad uno stato di attività proliferativa, nel quale si ha invece una netta prevalenza dei fattori promotori il fenomeno angiogenico (Ribatti, 2016).

Ancora, nel 1994, grazie agli studi di D'Amato, è il turno nell'evidenza clinica della capacità di inibire l'angiogenesi da parte della

talidomide, farmaco tristemente noto come responsabile della nascita di migliaia di bambini affetti da focomelia. La sua azione non si esplica sull' inibizione della componente infiammatoria, bensì si svolge come azione inibente direttamente sul vaso. (Ribatti, 2008, Vargesson 2015).

Oltre ad isolare altre molecole con tali capacità, il gruppo di studio di Harvard, ed in particolare il lavoro di Browder, è il responsabile nella dimostrazione che, agendo sul dosaggio di farmaci citotossici convenzionali, si può ottenere un effetto anti angiogenico. In particolare dobbiamo a loro la dimostrazione che, somministrando tali farmaci non più a dosaggi convenzionali (ossia alla massima dose tollerata, e quindi dovendo per forza sostenere delle pause necessarie al recupero funzionale delle cellule del midollo osseo e del tratto gastro intestinale) bensì senza soluzione di continuità (e quindi necessariamente portando ad una netta riduzione del loro dosaggio), si ottiene un maggior effetto apoptotico a carico delle cellule endoteliali dei vasi (Ribatti, 2008).

Attualmente la moderna ricerca farmacologica ha individuato nella terapia monoclonale, ossia basata sull'utilizzo di anticorpi, in particolare rivolti all' inibizione del VEGF, il più promettente filone terapeutico di maggior successo nel campo del contrasto all' angiogenesi neoplastica.

Possiamo affermare che ad oggi esistono nel nostro arsenale terapeutico più di 40 anticorpi terapeutici approvati dalla FDA (Food and drug administration, USA) e, accanto ad altre molecole giunte ormai nella parte terminale dei loro trials sperimentali, trovano indicazione non solo nel trattamento della patologia neoplastica, bensì ne traggono beneficio anche patologie immunologiche, ematologiche,

patologie del sistema immunitario e oculari (Deok-Hoon Kong et al, 2017).

Si vuole porre infine particolare attenzione a due lavori, di Douglas Hanahan e Robert Weinberg, pubblicati sul *Journal cell*, rispettivamente negli anni 2000 e 2011 con i rispettivi titoli “*The hallmarks of the cancer*” e “*Hallmarks of cancer: The next generation*”, dove si analizzano le sei capacità biologiche che una neoplasia acquisisce durante lo sviluppo neoplastico. Tra di esse un ruolo fondamentale viene espresso proprio dalle capacità di angiogenesi della neoplasia stessa (Ribatti, 2016)

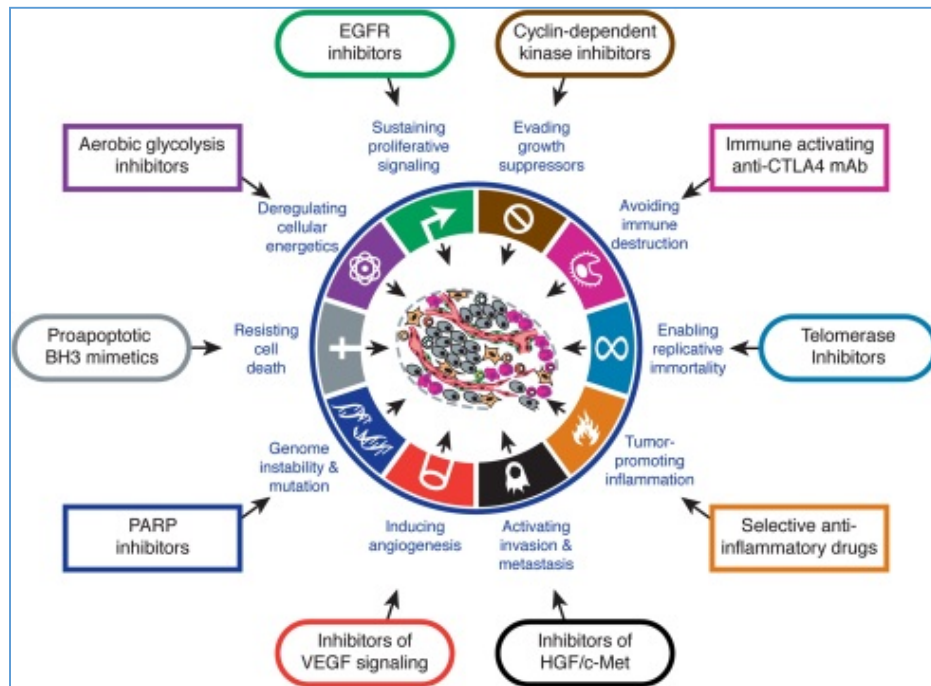


Figura 6: da “Hallmarks of cancer: the next generation “, di Hanahan e Weinberg, 2011.

CAPITOLO DUE

2.1 Vasculogenesi

La vasculogenesi è un processo tipico dello sviluppo embrionale e fetale. Con questo termine s'intende esclusivamente la formazione *ex novo* di vasi sanguigni dal mesoderma". Tale definizione è stata originariamente proposta da Risau nel 1997, e, precisamente identifica nelle cellule endoteliali progenitrici o angioblasti l'origine di tale processo (EPCs).

A questo processo si contrappone quindi l'angiogenesi che deve essere vista come lo sviluppo di vasi sanguigni in partenza da un letto vascolare pre-esistente (Drake, 2003; Ratajska et al, 2017).

Il processo di formazione dell'apparato vascolare si articola attraverso **4 distinte fasi** (Carmeliet and Jain 2011)

1-Comparsa delle cellule endoteliali progenitrici (Angioblasti)

2-Coalescenza e differenziazione degli angioblasti in strutture tubulari di cellule endoteliali che si organizzano in "Plessi capillari primari (Vasculogenesi).

3-la ramificazione di nuove diramazioni vascolari ("Sprout") a partire dalle strutture sopracitate (Angiogenesi).

4-si verifica il rimodellamento, l'espansione e la diversificazione funzionale, in arterie e vene, del network di vasi che si è venuto a creare. In tal modo si instaura una direzionalità di flusso.

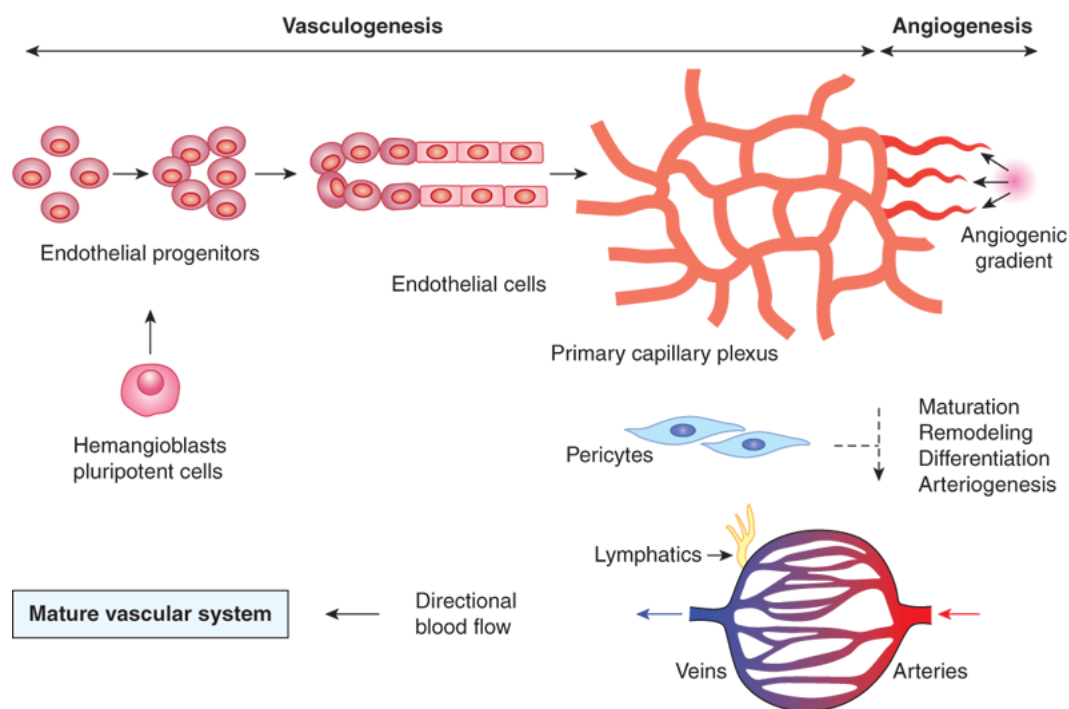


Figura 7: Cronologia della formazione e successivo sviluppo della rete vascolare (da “The basic Science of oncology, quinta edizione, 2013).

Mentre la vasculogenesi è confinata a fasi decisamente iniziali della vita intrauterina, l’angiogenesi verifica sia durante lo sviluppo embrionale, con l’espansione e la maturazione delle strutture vascolari primordiali, che durante il periodo dopo la nascita. Tale evento infatti è di fondamentale importanza sia condizioni fisiologiche, come si verifica ciclicamente nell’ utero durante il ciclo mestruale, sia in fasi di rimodellamento tessutale o di cicatrizzazione delle ferite, che in situazioni di malattia, come le flogosi croniche o nello sviluppo di una neoplasia maligna (Liekens et al., 2001).

La differenziazione di cellule del mesoderma in angioblasti e successivamente la loro differenziazione in tessuti si pensava fosse solo una esclusiva della vita embrionale. In realta’, nel 1997, Asahara et al, ribaltano il concetto, pubblicando un lavoro in cui identificavano cellule progenitrici ematopoietiche CD34+, le quali si dimostravano in

grado di differenziarsi in vivo in un fenotipo endoteliale. In particolare queste sono state riscontrate in focolai di danno ischemico. Tali cellule sono identificate come EPCs (Human endothelial progenitor cells) (Lee and Poh, 2014).

Le EPCs appaiono essere un gruppo eterogeneo di cellule provenienti da più precursori all'interno del midollo osseo e si possono osservare in differenti fasi della differenziazione endoteliale nel sangue periferico. Per tale motivo, una esatta caratterizzazione di queste cellule è difficoltosa, in quanto molti dei marcatori di superficie cellulare risultano condivisi sia da cellule staminali ematopoietiche che da cellule endoteliali adulte (Lee and Poh, 2014).

Tornando all'embriogenesi sappiamo che l'apparecchio circolatorio compare molto rapidamente già nel periodo pre-embrionale. L'apparato circolatorio trae origine completamente dal mesoderma, nel quale si rinvencono i primi abbozzi sotto forma di minuscoli ammassi cellulari solidi, le cosiddette "isole sanguigne".

Tali isole si allungano (prima iniziando dalla periferia) e si organizzano in cordoni, mentre le loro cellule si vanno poi differenziando. Le cellule superficiali si appiattiscono e formano l'endotelio, abbozzo della parete vascolare; le altre si dissociano e, nuotando nel liquido (che rappresenta il plasma primitivo) vanno a formare i precursori delle cellule ematiche. Questi micro-vasi embrionali si anastomizzano poi in una rete capillare primitiva che gradualmente si estende. Questo sistema vascolare primordiale è in grado di adattarsi a tutte le necessità, dapprima dell'embrione, poi del feto, ed infine dell'organismo in sviluppo e dell'adulto (Barone, 1993).

Circa le modalità di studio della vasculogenesi in medicina umana, è

importante sottolineare come, negli ultimi dieci anni, il pesce zebra (*Danio rerio*), piccolo pesce d'acqua dolce, è diventato un modello animale sempre più popolare.

Infatti gli embrioni del pesce zebra, facilmente ottenibili per fecondazione esterna, sono trasparenti, si sviluppano molto rapidamente (l'organogenesi si completa in pochi giorni dopo lo sviluppo) e la loro manipolazione genetica è diretta. Spesso la manipolazione genica permette di marcare in maniera fluorescente le cellule endoteliali formanti i vasi.

Per i motivi sopra menzionati il pesce zebra risulta un ottimo modello di studio in questa branca della medicina, ed è stato utilizzato per indagare diverse patologie inerenti l'apparato circolatorio. Tali patologie spaziano dalle malattie congenite, neoplastiche nonché tossicologiche (Ibrahim and Richardson, 2017; Asnani and Peterson, 2014).

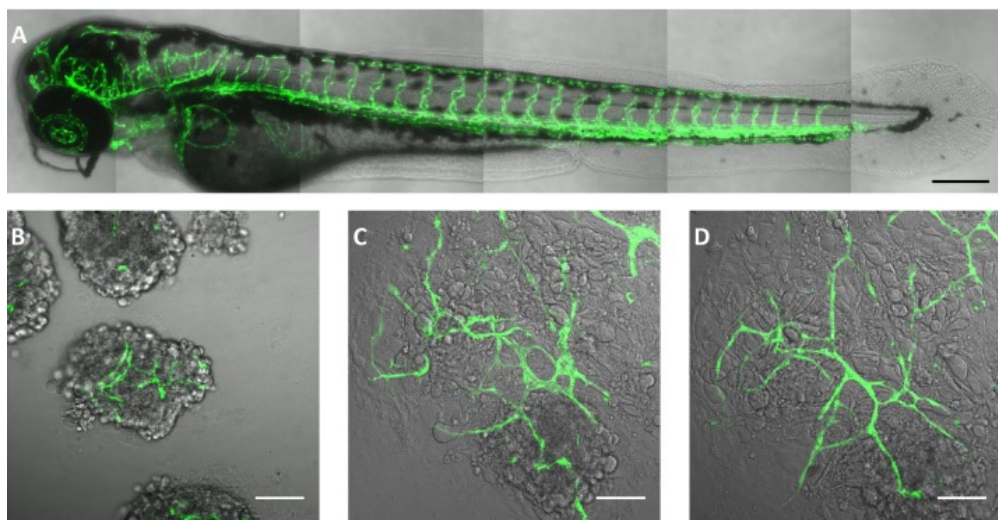


Figura 8: Imaging di zebrafish transgenico: **A-** intero embrione in cui si evidenzia la rete vascolare fluorescente formata dall' unione delle cellule endoteliali marcate . **(B, C e D)** Sviluppo del corpo embrionale nei giorni successivi di coltura (giorno 1, giorno 6 e giorno 8) su una miscela di collagene tipo I, GeltrexTM e substrato fibrinico, mostrando lo sviluppo di strutture vascolari della rete (da Ibrahim e Richardson, 2017).

CAPITOLO TRE

3.1 Angiogenesi

L' angiogenesi, il cui termine è stato introdotto dal chirurgo inglese John Hunter nel 1787, ossia la formazione di nuovi vasi a partire da un letto vascolare pre-esistente, avviene fisiologicamente, mostrandosi transitoriamente durante lo sviluppo embrionale, la riparazione di ferite, l'ovulazione e durante la proliferazione dell'endometrio che si verifica in corso di periodo mestruale (Al-Abd et al, 2017; Longo et al, 2005).

Se una angiogenesi fisiologica è strettamente e finemente controllata da tutta una serie di complesse e coordinate azioni, guidate da fattori pro e anti angiogenici, contrariamente una angiogenesi prolungata si riscontra spesso anche in condizioni patologiche non tumorali. Esempi classici ne sono il diabete mellito, la psoriasi, l'aterosclerosi, l'artrite reumatoide, la degenerazione maculare senile e tutta la serie delle retinopatie proliferative (Al-Abd et al, 2017; Deok-Hoon Kong, 2017).

E' ormai considerato un punto chiave dell'oncologia moderna come l'angiogenesi tumorale giochi un ruolo cruciale nel provvedere al fabbisogno di ossigeno e di nutrienti durante la crescita tumorale e si renda protagonista durante la crescita e l'acquisizione di un fenotipo metastatico (Deok-Hoon Kong, 2017).



Figure 13.33a The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

Figura 9: Si noti la diversa organizzazione della rete vascolare tra un tessuto sano e quello neoplastico. Nel caso si osserva l'organizzazione vascolare del tutto caotica che si apprezza in questa neoplasia dell'encefalo di un uomo (da "The biology of Cancer, 2014")

La crescita neoplastica si articola in 2 fasi

Fase "avascolare", nella quale assistiamo al raggiungimento di un volume massimo neoplastico di 2 mm, massima distanza attraverso la quale l'ossigeno diffonde per gradiente passivo. E' questa poi la condizione dei "carcinomi in situ", dove in questo stadio la neoplasia si appropria di nutrienti ed elimina i cataboliti attraverso processi di diffusione passiva. Questa fase di fatto non è in grado di far progredire le dimensioni della massa tumorale, ponendo la neoplasia in una condizione di "dormienza", mantenendo quindi un delicato equilibrio tra il numero di cellule che si replicano e il numero di cellule che vanno incontro ad apoptosi.

Fase “vascolare”, durante la quale si verifica un incremento della capacità di replicazione delle cellule e la neoplasia acquisisce capacità invasiva e metastatizzante.

Proprio l’inizio dell’acquisizione di tale capacità da parte di una neoplasia viene definito come “*angiogenic switch*”, ed è proprio tramite esso che il tumore acquisisce la capacità di crescere e portare alla disseminazione delle sue cellule a partire dalla massa primaria.

Tale fenomeno, che vedremo poi dettagliatamente, può essere innescato sia da condizioni di ipossia, ipoglicemia, meccanismi stressanti che da molecole infiammatorie. Ancora un importante ruolo è ricoperto anche da alterazioni genetiche, come la mutazione di alcuni oncogeni (Ras, Myc, Raf, HER-2/neu, c-Jun) e attraverso l’inattivazione di alcuni geni oncosoppressori (Loizzi et al, 2017, Longo et al, 2005).

Possiamo quindi definire lo switch angiogenico come un delicato e complesso equilibrio che si instaura tra fattori, prodotti sia dalla neoplasia che dall’ organismo ospite, prongiogenici ed inibenti, con una predominanza dei primi. In questo modo si ha la creazione della nuova rete vascolare neoplastica. Ancora sono proprio questi nuovi vasi a permettere la diffusione metastatica, essendo infatti scarsamente dotati di membrana basale e quindi una facile via d’ accesso al circolo dell’ospite (Burrell & Zadeh, 2012; Galeotti, 1997).

Come sopra menzionato, la rete vascolare creata dalla neoplasia, non porta alla formazione di vasi analoghi alla rete vascolare fisiologica dell’ospite, bensì si caratterizzano per essere vasi dilatati e tortuosi. Tali vasi creano un flusso ematico irregolare nel microambiente tumorale, portando all’ innesco di ulteriori batterie di fattori pro angiogenici, creando di fatto ulteriore stimolo alla creazione di questa

rete vascolare.

Questi fattori, non ancora del tutto chiariti, sono in parte secreti direttamente dal pool di cellule neoplastiche, come il Vascular endothelial growth factor (**VEGF**) e l'angiopoietina -1 (**Ang-1**), altre sono invece secrete da mastociti, macrofagi, linfociti T, componente cellulare questa presente nel microambiente tumorale.

Inoltre un importante ruolo è svolto dalla produzione di polipeptidi come l'Insulin like Growth factor (**IGF-1**), l'interleuchina 1 (**IL-1**), il Platelet Derived Growth Factor (**PDGF**), il Granulocyte-Monocyte-Colony Stimulating Factor (**GM-CSF**) (Kelly Burrell and Gelareh Zadeh, Longo et al, 2005), Galeotti, 1997).

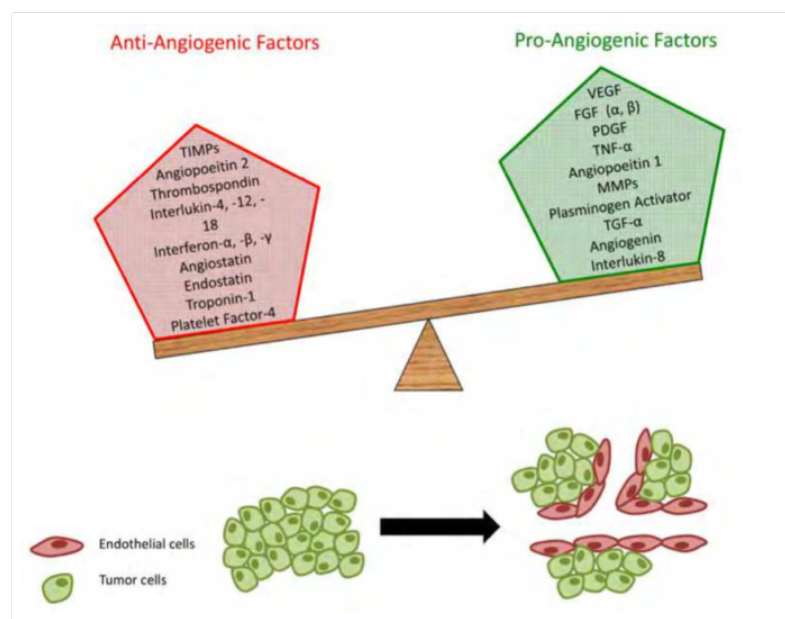


Figura 10: Equilibrio tra fattori promuoventi e inibenti l'angiogenesi da "The biology of Cancer, 2014).

Tra queste sostanze, un ruolo fondamentale lo giocano le **metalloproteasi**, enzimi essenziali per la degradazione della

membrana basale e della matrice extracellulare e, producendo anche un gel di fibrina, rendono di fatto possibile la creazione di quella architettura tridimensionale della nuova rete vascolare.

Tali metalloproteasi, che vedremo poi essere prodotte dalle cellule endoteliali dei vasi pre-esistenti che sono state “attivate” dalle sostanze precedentemente menzionate, fanno sì che queste cellule possano passare attraverso le molteplici fenestrature, andando a costituire nuovi vasi.

Ancora tale migrazione cellulare vedremo essere regolata da diverse molecole di adesione, tra le quali un ruolo primario è giocato dalle **integrine**, le **selectine** e le **caderine**. Infine la stabilizzazione dei nuovi vasi così formati avviene anche attraverso il contributo generato dal reclutamento dei **periciti**, cellule muscolari lisce e fibroblasti (Longo et al, 2005).

Infine è stato evidenziato anche un ruolo attivo da parte di precursori midollari che, in seguito a stimoli ischemici e/o citochimici, immessi nel focolaio neoplastico, contribuiscano al fenomeno angiogenico.

Possiamo quindi riassumere che si tratti di un **processo multi-step** che include numerose fasi, che schematicamente possono essere così riassunte:

Digestione della membrana basale ad opera di proteasi secrete dalle cellule endoteliali

Migrazione di cellule endoteliali circolanti nella sede di formazione di nuovi vasi

Proliferazione e differenziazione delle cellule endoteliali per allungare i vasi e formare il lume

Secrezione di fattori di crescita da parte delle cellule endoteliali,

che richiamano cellule muscolari lisce e periciti per costruire la membrana basale

Maturazione di queste cellule sotto forma di vasi e loro successiva regressione.

Vedremo in seguito di caratterizzare meglio ogni singola fase di questo processo.

CAPITOLO QUATTRO

4.1 Meccanismi Angiogenici

Come menzionato nel capitolo precedente, il processo angiogenico si basa su una serie di step ben precisi e coordinati.

Essi sono:

- 1- Attivazione delle cellule endoteliali in risposta ad uno stimolo ipossico e rilascio di fattori angiogenici e chemoattrattori
- 2- Digestione della membrana basale ad opera di proteasi secrete dalle cellule endoteliali
- 3- Migrazione di cellule endoteliali circolanti nella sede di formazione di nuovi vasi
- 4- Proliferazione e differenziazione delle cellule endoteliali per allungare i vasi e formare il lume
- 5- Secrezione di fattori di crescita da parte delle cellule endoteliali, che richiamano cellule muscolari lisce e periciti per costruire la membrana basale
- 6- Stabilizzazione del vaso. Il ruolo delle molecole di adesione

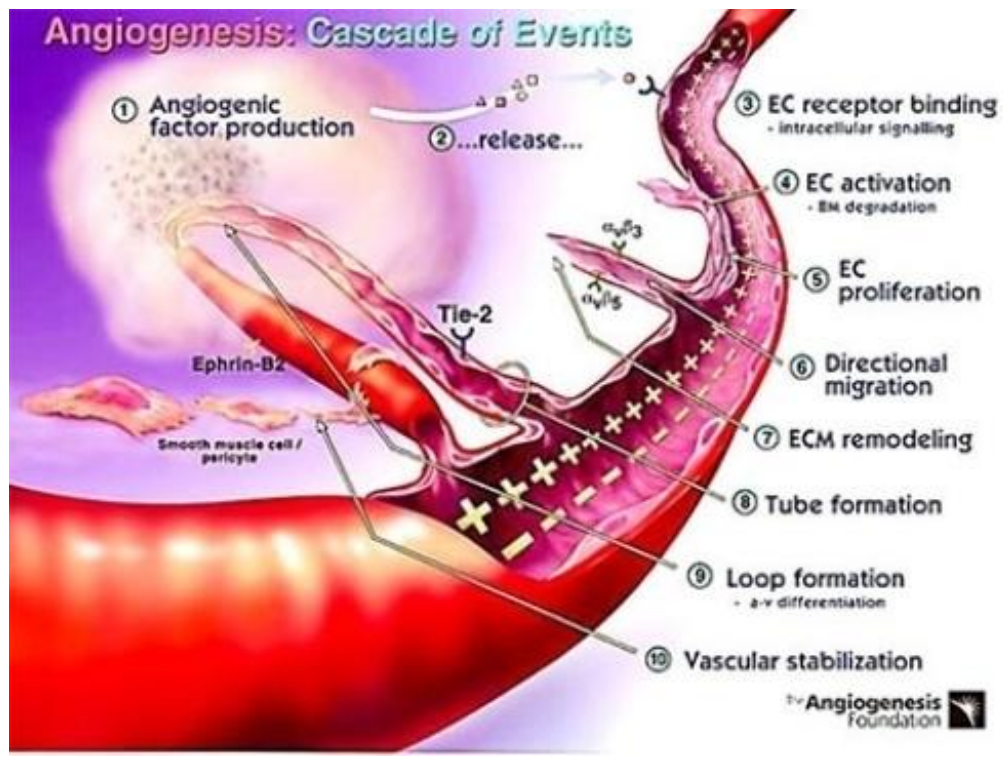


Figura11: la cascata angiogenica, da www.angio.org (Angiogenesis Foundation)

4.1.1 Attivazione delle cellule endoteliali in risposta ad uno stimolo ipossico e rilascio di fattori angiogenici e chemoattrattori

Ipossia, flogosi e stress di natura meccanica sono condizioni in grado di innescare rapidamente una risposta angiogenica. Questi stimoli attivano sia direttamente che indirettamente le cellule endoteliali a produrre e rilasciare citochine e fattori di crescita.

Questi mediatori biochimici, tramite vie autocrine e paracrine, inducono alterazioni nel flusso emodinamico dei vasi preesistenti e si verifica l'extravasazione di proteine plasmatiche. Si instaura un aumento di permeabilità che porta alla perdita delle molecole di adesione. Le giunzioni, formate principalmente, dall'interazione tra le caderine dell'endotelio vascolare, vengono a cadere e la formazione di fenestrazioni induce una attività di migrazione cellulare (Milkiewicz et al., 2006; Pepper, 2001; Dejana et al., 2006). Le cellule così attivate

ad un fenotipo migratorio necessitano, oltre alla rottura dei contatti interendoteliali, di liberarsi dal supporto periendoteliale; a questo scopo secernono nell'ambiente extracellulare vari tipi di proteinasi

4.1.2 Digestione della membrana basale ad opera di proteasi secrete dalle cellule endoteliali

Tutti i tessuti si organizzano nel nostro organismo tramite compartimenti separati da vere e proprie barriere fisiche, separati tra di loro dalla matrice extracellulare, costituita da tessuto connettivo lasso interstiziale in continuità con le membrane basali.

L'analisi costitutiva di tali strutture ha mostrato come nel tessuto connettivo lasso interstiziale si abbia il prevalere di diversi tipi di collagene fibrillare e glicoproteine come la fibronectina, mentre le membrane basali sono costituite essenzialmente da collagene di tipo IV e V e, come componente glicoproteica, dalla laminina (Galeotti, 1997).

Ora, se consideriamo come prima fase del processo invasivo l'instaurarsi della adesione con le molecole della matrice extracellulare, subito dopo si verifica la secrezione di enzimi proteolitici che degradano gli stessi componenti della matrice, quali i vari tipi di collagene, la fibronectina e i proteoglicani (Pontieri, 1996).

Sostanzialmente questa serie di processi si attua attraverso due meccanismi:

- **Il sistema attivatore del plasminogeno (t-PA)**
- **L'attivazione delle metalloproteinasi di matrice (MMPs).**

Sappiamo infatti che molte cellule neoplastiche sono in grado di secernere un attivatore del plasminogeno (PA), ossia una serin-proteasi attiva sul plasminogeno, prodotta dagli epatociti.

Tramite idrolisi, il legame tra plasminogeno e suo attivatore, porta alla comparsa della plasmina, la cui azione è quella di un potente fibrinolitico e, grazie anche alla sua azione tripsina simile, è in grado di idrolizzare un gran numero di proteine, come le glicoproteine presenti nella matrice extracellulare.

Ricordiamo infine che il plasminogeno non è presente solo a livello del sangue, bensì una quota considerevole (30-40%) si rinviene anche nel liquido interstiziale delle membrane basali (Pontieri, 1996).

Per la precisione l'attivazione del plasminogeno a livello ematico è data dal tPA, mentre a livello tissutale l'interazione è regolata dal uPA che si attiva per specifico legame con il suo recettore uPAR (Pontieri, 1996).

Le metalloproteinasi, dette pure matricine, fanno parte di una famiglia di enzimi correlati tra loro ed individuati in molte specie, dai celenterati all'uomo. Il termine anglosassone “matrix metalloproteinase” (MMP) definisce questi enzimi in modo molto appropriato, sottolineando la dipendenza della loro attività da ioni metallici e la loro capacità di degradare le proteine strutturali della matrice extracellulare (Sternlicht e Werb, 2001).

Nell' uomo ne sono state identificate circa 22, nei vertebrati 25. La loro azione si esplica sia attraverso processi fisiologici che patologici. In particolare in questi ultimi, e ancora più nello specifico nelle neoplasie maligne, le **MMPs** subiscono un processo di **up-regulation**, la cui caratteristica più importante è la capacità delle cellule di attraversare i limiti tissutali e, in caso di neoplasie, metastatizzare in

diverse parti dell'organismo. Di conseguenza, gli enzimi che degradano la ECM sono indispensabili per la distruzione delle barriere preposte contro l'invasività (Sternlicht e Werb, 2001; Remacle et al., 2005).

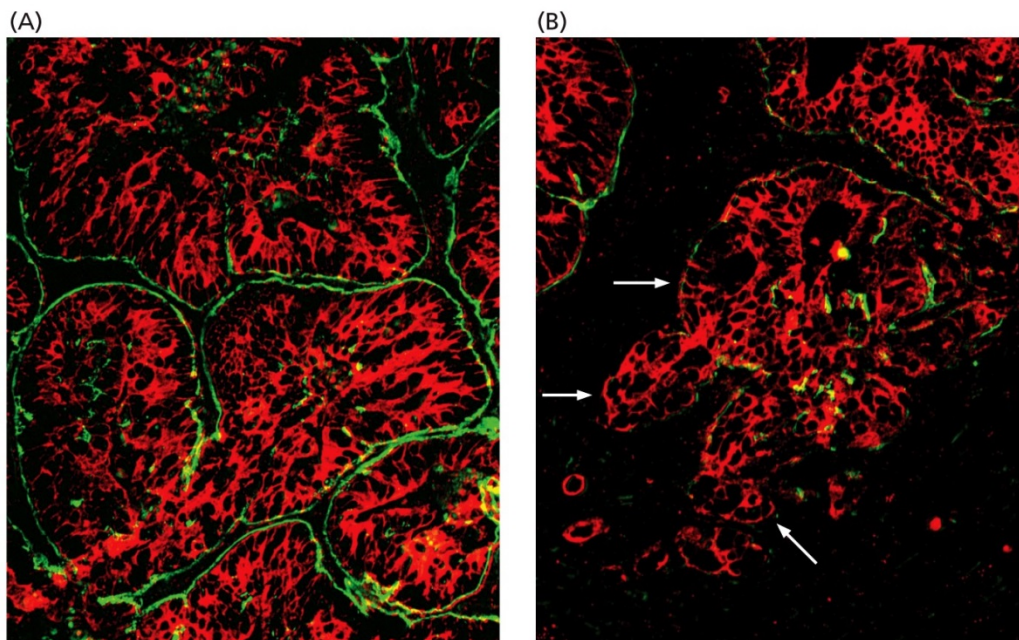


Figure 14.4ab The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

Figura 12: Apertura di un varco attraverso la membrana basale: si noti in figura A la membrana basale, marcata attraverso Ab anti –laminina in una porzione di carcinoma colon-retto ben differenziato. In figura B, il carcinoma medesimo appare meno differenziato.

Da un punto di vista della patologia neoplastica, e in particolar modo facendo riferimento al meccanismo angiogenico, sono le **Gelatinasi**, ossia metalloproteinasi con specifica attività nei confronti del **collagene IV**, a ricoprire un ruolo fondamentale.

4.1.3 Migrazione di cellule endoteliali circolanti nella sede di formazione di nuovi vasi

Quando parliamo di migrazione delle cellule endoteliali facciamo

riferimento al movimento, alla forma e alla polarità che tali cellule assumono durante la creazione dei vasi. Tali fenomeni mostrano una stretta dipendenza da diversi fattori, come proteine della matrice extracellulare, molecole di adesione e le proteine del citoscheletro. Questi movimenti, di tipo lombricoide, che si estrinsecano attraverso la capacità della cellula di estroflettere sue parti di membrana formando la cosiddetta lamella motoria (leading lamella).

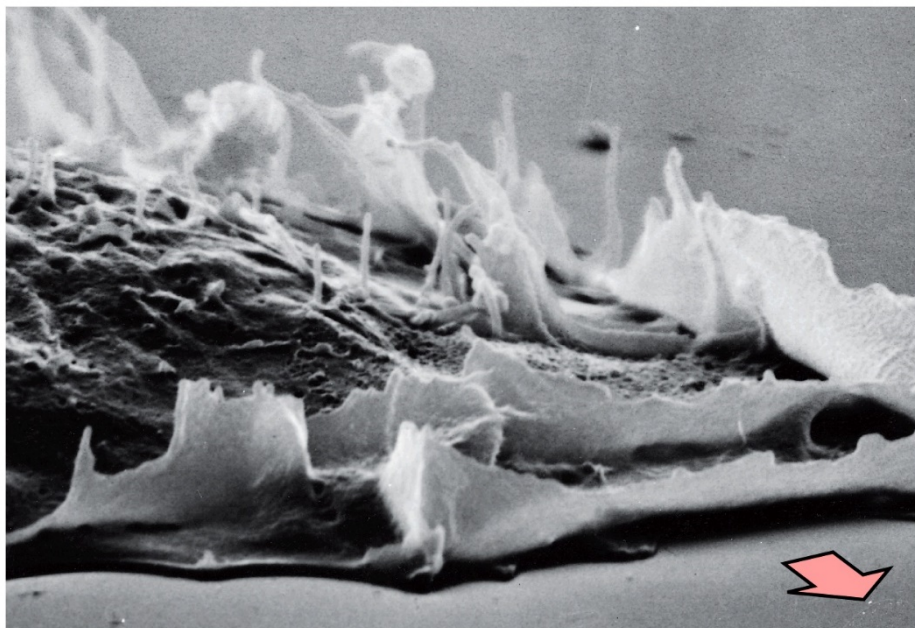


Figure 14.37a The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

Figura 13: Fotografia al microscopio elettronico di lamelle motorie, in grado di esercitare un movimento di locomozione in direzione della freccia (da “The biology of cancer, second edition, R Weinberg, 2014).

Tali osservazioni, in ambito oncologico in particolare nei carcinomi e dei gliomi, hanno portato alla scoperta che il movimento di queste cellule è più rapido rispetto alla componente cellulare normale. Ancora, nell'urina del carcinoma vescicale dell'uomo, è stata individuata una proteina, chiamata **AME** (autocrine motility factor), in grado di stimolare solo il movimento di cellule neoplastiche

(Pontieri, 1996).

Proliferazione e differenziazione delle cellule endoteliali per allungare i vasi e formare il lume

Una volta avvenuta la degradazione della membrana basale e la successiva migrazione da parte delle cellule endoteliali, si verifica la proliferazione di queste ultime, grazie alla prevalenza dei fattori pro-angiogenici su quelli inibenti. Si osserva quindi un nutrito gruppo di molecole che possono di fatto essere suddivise in 3 grandi gruppi secondo Lickens et al

A-molecole con diretta azione sulle cellule endoteliali (famiglia del VEGF e delle angiopoietine)

B-molecole con azione diretta verso cellule sia endoteliali che non endoteliali (citochine e enzimi angiogenici, il più noto è il peptide FGF2)

C-molecole che, tramite azione indiretta, mediano il rilascio di altri fattori proangiogenici da parte di cellule infiammatorie e/o neoplastiche (TNF e TGF)

A. molecole con diretta azione sulle cellule endoteliali (famiglia del VEGF e delle angiopoietine):

La molecola più nota è il **VEGF** (vascular endothelial growth factor), o meglio le sue 6 isoforme

1-VEGF-A o VEGF

2-PlGF

3-VEFG-B

4-VEGF-C

5-VEGF-D

6-VEGF-E

Per capirne l'importanza svolta da tale gruppo di molecole e' sufficiente citare che la sola perdita di un singolo allele VEGF porta a morte l'embrione (Lickens et al, 2001).

VEGF è espresso in diversi tessuti, tra cui cervello, rene, fegato e milza, e da molti tipi di cellule. In vitro, VEGF stimola la degradazione, la proliferazione, la migrazione e la formazione di tubi delle cellule endoteliali ECM e induce in queste cellule l'espressione di uPA, PAI-1, uPAR e MMP-1. In vivo, VEGF è stato dimostrato di regolare la permeabilità vascolare, importante per l'iniziazione dell'angiogenesi (Veikkola T, Alitalo K., 1999; Dvorak HF et al, 1995, Lickens, 2001).

Circa le angiopoietine esse sono state scoperte attraverso l'individuazione di 2 specifici recettori tirosin-chinasici a carico delle cellule endoteliali. Tali recettori sono stati identificati con il nome di **TIE-1** e **TIE-2**. In particolare si è osservato un ruolo complementare tra VEGF e angiopoietine, dove il primo promuove differenziazione e proliferazione, mentre il secondo gruppo agisce tramite una azione di rimodellamento e stabilizzazione dei vasi, interagendo con la matrice extracellulare (Lickens et al, 2001).

B. molecole con azione diretta verso cellule sia endoteliali che non endoteliali (citochine e enzimi angiogenici, il più noto è il peptide FGF-2)

La famiglia delle FGF conta circa 19 membri, tutte queste sono molecole proteiche ad alta affinità per l'eparina. Sebbene presente in molti tessuti, raggiunge le massime concentrazioni

nel cervello e nell' ipofisi. La sua azione è sia di stimolazione, chemiotassi delle cellule endoteliali che sia integrazione e comunicazione tra queste

C. **molecole che, tramite azione indiretta**, mediano il rilascio di altri fattori proangiogenici da parte di cellule infiammatorie e/o neoplastiche (TNF e TGF), il cui effetto sull'angiogenesi si esplica col rilascio di molecole come citochine e fattori di crescita da parte di macrofagi e cellule endoteliali, come il Tumor Necrosis Factor (α - TNF), il Transforming Growth Factor (TGF) e il Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) (Liekens et al., 2001; Lichtenbeld et al., 1996).

secrezione di fattori di crescita da parte delle cellule endoteliali, che richiamano cellule muscolari lisce e periciti per costruire la membrana basale

In questa fase, dove assistiamo alla proliferazione e alla migrazione delle cellule endoteliali, si assiste al cosiddetto intervento delle molecole di adesione (Liekens, 2001)

Da un punto di vista del meccanismo, l'adesione tra cellule può essere giunzionale o non giunzionale.

Le strutture d' adesione giunzionale sono delle vere e proprie strutture specializzate della membrana plasmatica e se ne distinguono 3 tipologie:

1. Desmosomi
2. Giunzioni strette
3. Giunzioni discontinue e sinapsi chimiche

Per quanto concerne l'adesione non giunzionale essa è invece costituita da modificazioni dello strato esterno della membrana

o da intervento di molecole di adesione che tengono unite le membrane cellulari contigue.

Le principali famiglie in cui si raggruppano le molecole di adesione sono:

Selectine (endoteliali “E”, piastriniche “P”, leucocitarie “L”)

Caderine

Superfamiglia delle immunoglobuline

Integrine

Ognuna di esse svolge un ruolo nel processo di angiogenico (Liekens, 2001)

Le **integrine** sono molecole proteiche costituite da eterodimeri. Sono costituite da catene alfa e beta tra loro da legame covalente. Funzionano come un recettore per le proteine della matrice extracellulare. Ancora sono in grado di partecipare alla trasduzione di segnale che trasporta all'interno della cellula l'informazione sulla struttura della matrice. In particolare, riveste importanza nella biologia della neoangiogenesi e nei processi neoplastici, la regolazione, mediata da integrine, degli enzimi cellulari che degradano il connettivo interstiziale e i componenti della membrana basale. Da qui l'importanza di questa classe di molecole d'adesione, non solo durante la fase terminale del processo neoangiogenico (formazione vera e propria della struttura vasale), ma anche nella fase di moltiplicazione e migrazione delle cellule endoteliali.

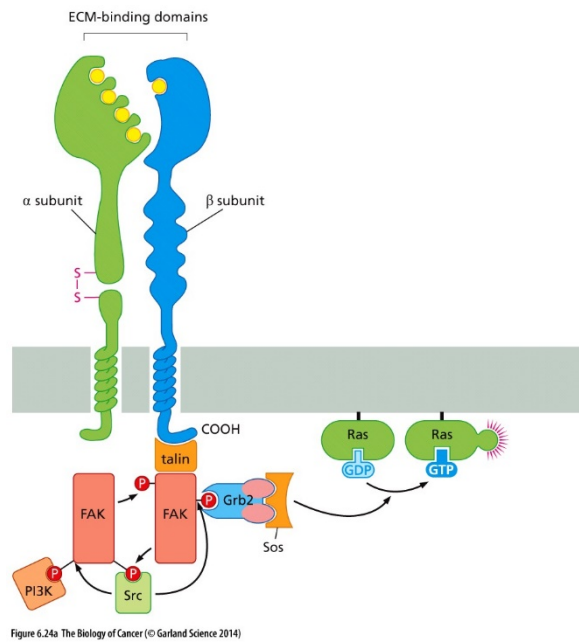


Figura 14 : Il segnale mediato dalle integrine. In figura si apprezzano i due eterodimeri , subunita' alfa e beta, legate tra loro da legame covalente. (da “The biology of cancer, second edition, R Weinberg, 2014).

Oltre alle molecole “integrine” riconosciamo le **caderine** dell'endotelio vascolare (VE-caderine). Queste regolano le interazioni intercellulari calcio-mediate e una loro carenza porta a morte l'embrione (Liekens et al., 2001).

Molecole d'adesione intercellulare-1 (ICAM-1), e molecole d'adesione delle cellule vascolari-1 (VCAM-1), appartenenti alla superfamiglia delle immunoglobuline, sono normalmente espresse dall'endotelio quiescente, ma risultano notevolmente aumentate in seguito a stimolazione di TNF, IL-1, IFN- γ . Infine le **selectine** hanno un ruolo fondamentale al fine di reclutare i leucociti circolanti. Sono anche esse espresse dalle cellule endoteliali. (Liekens et al., 2001).

CAPITOLO CINQUE

Introduzione

Le metalloproteinasi (MMPs), chiamate anche “*matricine*” o “*matrixine*”, sono delle proteine appartenenti alla famiglia di endopeptidasi contenenti zinco, un insieme di enzimi strettamente correlati tra loro, presenti in molte specie animali oltre che nell’uomo. Esse sono una famiglia di endopeptidasi appartenenti al gruppo delle metzincine (King, 2016). Il termine anglosassone “*matrix metalloproteinase*” (MMPs) è decisamente appropriato in quanto descrive sia la loro dipendenza nei confronti di ioni metallici che la loro capacità di degradare diverse componenti proteiche strutturali della matrice extracellulare (Sternlicht e Werb, 2001).

5.1 Matrice extracellulare

Per matrice extracellulare o ECM (*Extracellular matrix*) si intende la più complessa unità di organizzazione strutturale dei tessuti degli organismi viventi. I tessuti, infatti, non sono costituiti solo da cellule: extracellulare, occupato da un network di macromolecole, la cui organizzazione tridimensionale rappresenta appunto l'ECM. Proprio i tessuti connettivi differiscono da quelli epiteliali in virtù dell’abbondante contenuto di matrice extracellulare, in cui le cellule sono disperse. L'analisi dell'ECM da un punto di vista biochimico rivela che essa è composta da una serie di proteine e polisaccaridi, che si aggregano in un reticolo organizzato in maniera compatta e connesso alla superficie delle cellule che l'hanno prodotto e di quelle circostanti. (Folkman, 2008)

In passato si credeva che l'ECM servisse principalmente da impalcatura relativamente inerte, con funzione statica di stabilizzare la struttura fisica dei tessuti. In realtà, oggi, è ormai ampiamente dimostrato che l'ECM rappresenta il substrato su cui tutte le cellule dei tessuti possono aderire, migrare, proliferare e differenziarsi. Infatti, le macromolecole dell'ECM sequestrano fattori di crescita, molecole come l'acqua o i minerali, e controllano fenomeni fisiologici, quali la morfogenesi, fisiopatologici, quali la guarigione delle ferite e patologici, quali l'invasione e la metastatizzazione tumorale. (Robbins e Cotran, 2016; Ribatti, 2016).

E' ormai consolidato che il rimodellamento a carico della matrice extracellulare che si osserva durante la progressione verso il fenotipo maligno della neoplasia, sia in grado di alterare il comportamento e della componente cellulare neoplastica che di quella cellulare stromale. Durante questo avanzamento si assiste al reclutamento di una grande varietà di cellule ospiti che, combinandosi con la composizione e struttura alterata della ECM, creano il cosiddetto microambiente tumorale o microenvironment (Folkman, 2008).

L' ECM si presenta in due forme:

- I. Come **matrice interstiziale**, presente tra gli spazi che intercorrono tra le cellule nei tessuti connettivi, tra gli epiteli dei vari parenchimi e nelle strutture di supporto sia delle strutture vascolari che delle strutture muscolari lisce.

Alla sua sintesi sono preposte le cellule mesenchimali, quali ad esempio i fibroblasti.

- II. Come **membrana basale**, ossia una struttura altamente specializzata e ben organizzata intorno alle cellule epiteliali, alle cellule endoteliali e alle cellule muscolari lisce.

La membrana basale è sintetizzata grazie al contributo dell'epitelio sovrastante e delle cellule mesenchimali sottostanti, formando una maglia cosiddetta a "piede di pollo".

I principali costituenti sono il collagene amorfo non fibrillare di tipo IV e la laminina. Ha uno spessore che varia dai 70 ai 300 nm.

Matrice extracellulare

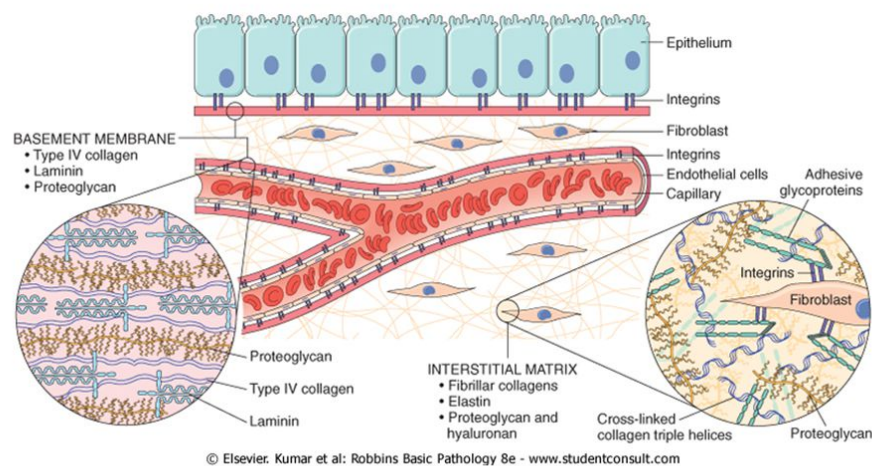


Figura 15: Matrice extracellulare tratta dal Robbins, “Basic Pathology”, 8^a edizione, 2007.

Le componenti principali della matrice extracellulare possono essere raccolte in tre differenti gruppi di proteine: (Robbins & Cotrain, 2016)

5.1.1 Glicosamminoglicani (Gag):

Catene di polisaccaridi solitamente uniti a proteine tramite legami covalenti per formare i PROTEOGLICANI (PG). Questi ultimi possono essere ricchi di gruppi solfato (il condroitinsolfato, il

dermatansolfato, l'eparansolfato e il cheratansolfato) o privi (l'acido ialuronico). Hanno funzione di resistenza a forze compressive e di lubrificazione.

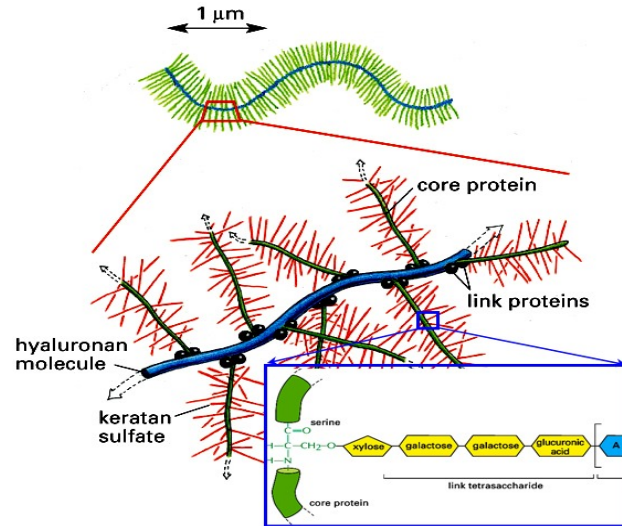


Figura 16: struttura del proteoglicano “Molecular biology of the cell”, 4 edizione, 2002.

5.1.2 Proteine Fibrose Strutturali

Le proteine fibrose strutturali vengono suddivise in due sottogruppi:

- A) Con funzione principalmente strutturale (collageni ed elastina)
- B) Con funzione principalmente adesiva (fibronectina, laminine, entactine o nidogeni e vitronectina).
- C)

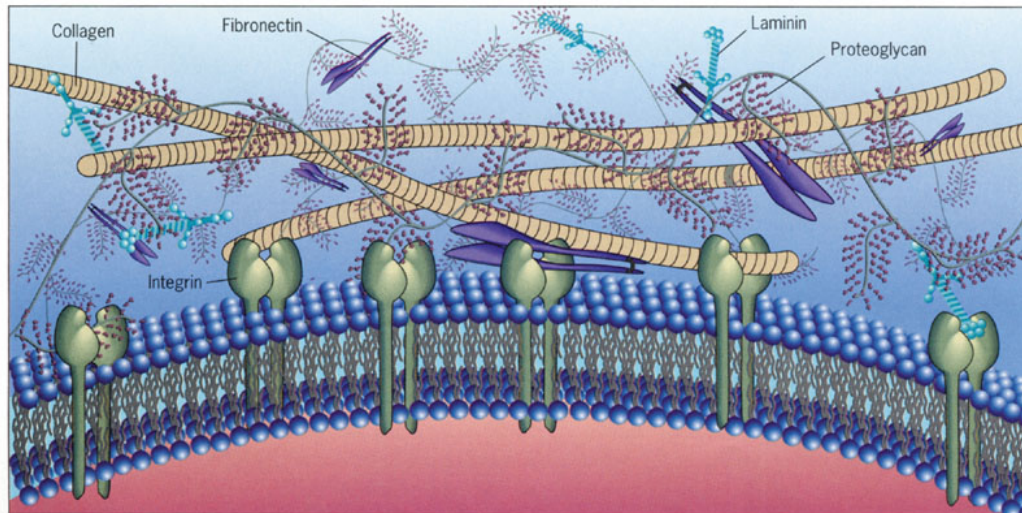


Figura 17: struttura ECM Aota, S. and Yamada, K. M. (1995) Fibronectin and Cell Adhesion: Specificity of Integrin–Ligand Interaction, in *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, Volume 70 (eds F. F. Nord and A. Meister), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.

5.1.3 Glicoproteine Adesive

Gran parte delle macromolecole dell'ECM può stabilire interazioni altamente funzionali con le cellule di un tessuto grazie alla presenza di recettori espressi sulla loro superficie. Tra questi recettori un ruolo chiave viene svolto dalle integrine, che esplicano due ruoli fondamentali, quali: l'adesione da parte di una cellula alla ECM e la trasduzione del segnale dalla ECM all'interno della cellula.

Ciascuna integrina è un eterodimero transmembranario costituito da due subunità associate, α e β , legate mediante legami non covalenti.

Ogni subunità presenta:

- un grande dominio extracellulare in cui sono presenti i siti di legame per la ECM, catione-dipendenti;
- un frammento transmembrana corto;
- un piccolo dominio intracellulare, collegato funzionalmente al citoscheletro e privo di attività catalitica. Prima del contatto con

la ECM gli eterodimeri di integrina sono in una configurazione inattiva con il loro dominio extracellulare in una conformazione ripiegata ed i due domini citoplasmatici legati tra loro, con α che inibisce l'interazione di β con il citoscheletro di actina.

Il legame delle integrine all'ECM provoca a livello citoplasmatico il reclutamento di proteine responsabili della formazione di piccole strutture adesive che prendono il nome di complessi di adesione cellula matrice (MACs). Una volta attivate, grazie alla GTPasi della proteina RHO.

Le integrine, una volta che avviene il legame con i componenti dell'ECM, sono in grado inoltre di trasmettere segnali biochimici all'interno della cellula che le esprime.

Recentemente è stato identificato un gran numero di mediatori dell'attivazione cellulare indotta dalle integrine: chinasi della famiglia Src (oncogene trasformante del virus del sarcoma di Rous) e della famiglia delle adesioni focali, il cui prototipo è FAK (chinasi delle adesioni focali); serino-treonino-chinasi, come la PKC (proteina-chinasi di tipo C) e le MAPK (proteine-chinasi attivate dai mitogeni);

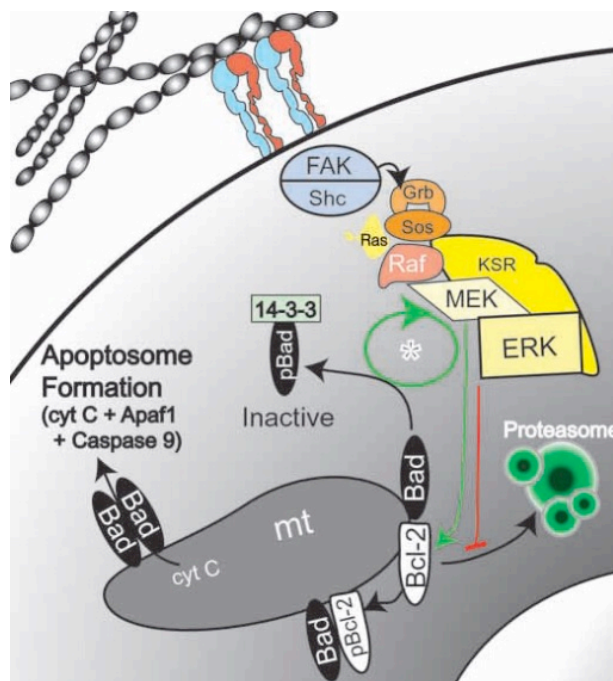


Figura 18: Stupack DG, Cheresch DA.. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. J Cell Sci 115(Part 19): 3729-3738, 2002.

5.1.4 Le Metalloproteasi

Le metalloproteinasi della matrice (MMPs), inizialmente, trovavano un ruolo fondamentale nell'adeguato rimaneggiamento della matrice extracellulare (ECM), nello sviluppo embrionale, nella morfogenesi, nel riassorbimento e nel rimodellamento tissutale. Tuttavia, recenti studi hanno evidenziato un loro ruolo non solo nella regolazione del comportamento cellulare di diversi substrati, come fattori di crescita, diverse citochine e numerosi recettori cellulari, ma anche nella processazione di un gran numero di molecole bioattive, contribuendo notevolmente al microambiente tissutale (Mateusz Maciejczyk et al, Ribatti, 2016; Nagase e Woessner,1999).

Di conseguenza, esse giocano un ruolo fondamentale nei processi fisiologici di rimodellamento del tessuto osseo, nell'angiogenesi e nella guarigione delle ferite, ma sono coinvolte anche nello sviluppo

di patologie come l'artrite reumatoide, la sclerosi multipla e infine nel processo di metastatizzazione di una neoplasia (King, 2016; Lindberg et al, 2001).

Le MMPs subiscono infatti una *up-regulation* in corso di patologie neoplastiche maligne, la cui caratteristica più importante si estrinseca proprio nella capacità di queste cellule di superare le barriere tissutali e dunque di metastatizzare in diverse parti dell'organismo.

Infatti, l'angiogenesi che si sviluppa in un tumore è principalmente mediata dalla stimolazione e migrazione di cellule endoteliali quiescenti (in alcuni tumori partecipano esse stesse al processo angiogenetico, in altri si sviluppano da precursori cellulari endoteliali di provenienza midollare che migrano all'interno della massa) che si mobilitano da una pre-esistente rete vascolare matura e che tendono ad entrare all'interno della nuova massa tumorale. In questo caso le MMPs, degradando la matrice extracellulare (ECM) sono indispensabili per la distruzione delle barriere preposte contro l'invasività (Folkman, 2008; Sternlicht e Werb, 2001).

Dunque, si comprende quanto queste molecole non debbano essere considerate solo dei semplici degradatori della membrana extracellulare, ma al contrario, rientrano in un complesso apparato di comunicazione con il quale cellule epiteliali e neoplastiche interagiscono con lo stroma circostante, modificandolo (Ribatti 2016; Hamacher et al 2004).

Classificazione

Le proteasi o enzimi proteolitici, sono classificati, in base alla loro attività di clivaggio dei legami peptidici, in esopeptidasi e

endopeptidasi, rispettivamente se la rottura avviene in corrispondenza del legame peptidico terminale o interno. Le proteasi sono classificate in cinque principali classi catalitiche e di sensibilità agli inibitori in serina proteasi, cisteina proteasi, aspartico proteasi, treonina proteasi e le metalloproteasi (Sternlicht & Werb, 2001).

Le metalloproteasi sono ulteriormente suddivise in cinque superfamiglie

- 1) *Astacine*
- 2) *ADAMs/ Adamalysine*
- 3) *Metzincine*
- 4) *Serralisine*:
- 5) *Pappalysine*

La superfamiglia delle Metzincine è quella di maggiore interesse poichè comprende la famiglia delle Matrixine (Folkman 2008, Sternlicht & Werb, 2001; Vandenbroucke & Libert, 2014).

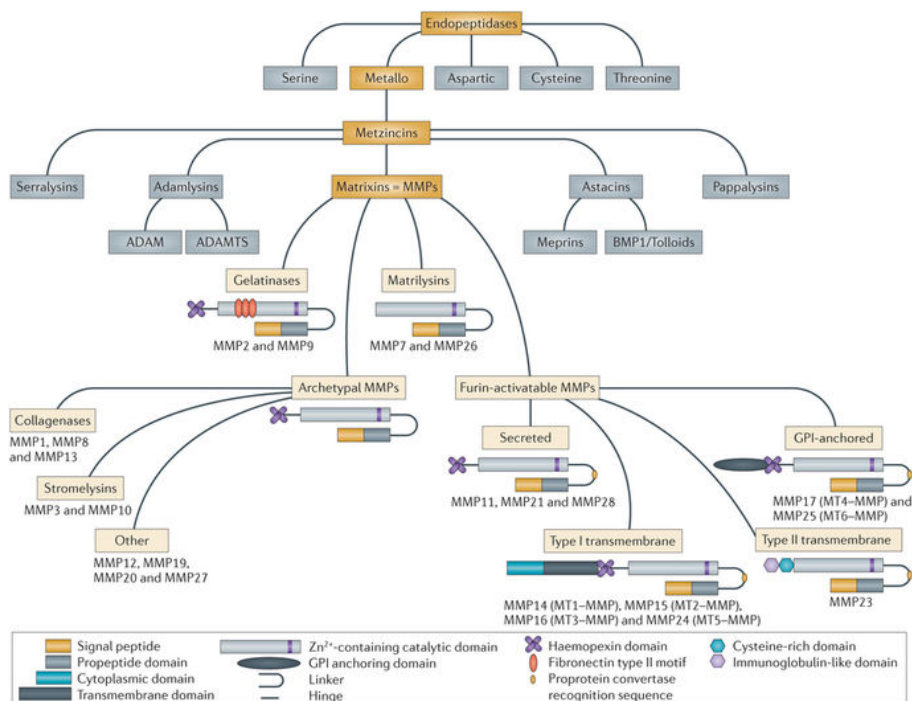


Figura 19: classificazione delle Endopeptidasi Vandenbroucke RE, Libert C, Nat Rev Drug Discov. 2014 Dec;13(12):904-27.

La superfamiglia delle Metzincine è caratterizzata da un dominio catalitico, che contiene il motivo HEXXHXXGXXH Z di legame con lo Zn^{2+} , in cui lo ione Zinco è chelato a tre residui di istidina, e una metionina conservata, formando un “Met turn”, otto residui a valle, che sorregge la struttura del sito attivo attorno allo Zn^{2+} catalitico e conferisce un ambiente idrofobico per lo ione Zinco. (Remacle et al., 2005). Nello specifico:

Le **Serralisine**, che presentano una prolina in posizione Z e sono importanti enzimi batterici, attivi nella virulenza e patogenicità di diversi microrganismi.

Le **Astacine**, mostrano un acido glutammico in posizione Z ; rappresentata dalla C-proteinasi del pro-collagene, il cui compito è la rimozione dei componenti del pro-collagene fibrillare.

Le **ADAM** e **ADAMs**, presentano come aminoacido l'acido aspartico in posizione Z . Si tratta di enzimi solubili presenti in diversi veleni di serpente, ad azione molto aggressiva nel degradare la ECM.

Le **Pappalisine** intervengono nel clivaggio delle proteine che legano il fattore di crescita insulino-simile.

Metalloproteasi

Storicamente la prima metalloproteinasi fu descritta nel 1962, da Gross e Lapiere in seguito all'osservazione della degradazione della tripla elica di collagene nel processo di riassorbimento della coda del girino durante la metamorfosi. Tale enzima, una collagenasi, si scopri giocare un ruolo cruciale nel normale sviluppo e crescita degli anfibi,

attraverso il mantenimento di un delicato equilibrio tra sintesi e degradazione dei componenti della matrice stessa (Amin et al, 2017; Maciejczyk et al 2016).

Si suddividono ulteriormente in 6 gruppi in relazione alla tipologia di substrato con cui vanno ad interagire:

- I. Collagenasi
- II. Gelatinasi
- III. Stromalisine
- IV. Matrilisine
- V. Membran-type MMPs
- VI. Altre MMPs

Class	MMP number	Primary natural substrates
Collagenases	MMP-1	Collagens I, II, III, VII, VIII, X Pro-MMP-1,2,9
	MMP-8	Collagens I, II, III, V, VII, VIII, X Gelatin, fibronectin
	MMP-13	Collagens IV, IX, X, XIV Gelatin, fibronectin
Gelatinases	MMP-2	Gelatin, collagens IV, VI, X elastin, fibronectin
	MMP-9	Gelatin, elastin, collagens IV, V, VII, X, XIV
Stromelysins	MMP-3	Laminin, gelatin, aggrecan, fibronectin
	MMP-10	Collagens III, IV, V, gelatin, casein, elastin, MMP-1,8
	MMP-11	Fibronectin, laminin, gelatin, aggrecan
Matrilysins	MMP-7	Collagens IV-X, fibronectin, laminin, gelatin, aggrecan, pro MMP-8
	MMP-26	Gelatin, collagen IV, Pro MMP-9
Membrane type MMPs	MMP-14 (MT-1 MMP)	Collagens I-III, gelatin, fibronectin, laminin, tenascin, aggrecan
	MMP-15 (MT-2 MMP)	Fibronectin, laminin, perlecan, aggrecan
	MMP-16 (MT-3 MMP)	Collagen III, gelatin, casein
	MMP-17 (MT-4 MMP)	Fibrinogen
	MMP-24 (MT-5 MMP)	Proteoglycans
	MMP-25 (MT-6 MMP)	Collagen IV, gelatin, fibrin, fibronectin
Other MMPs	MMP-12	Elastin, gelatin, collagens I,IV, fibronectin proteoglycan, vitronectin, laminin
	MMP-19	Collagen I
	MMP-20	Amelogenin, aggrecan
	MMP-21	Gelatin
	MMP-23	Gelatin
	MMP-27	Casein
	MMP-28	Casein

Data taken from Yadav et al. [1], Verma and Hansch [2], and Lohi et al. [3].
MMP: Matrix metalloproteinase

Figura 20: Struttura e nomenclatura della famiglia delle MMPs **Lalita Yadav et al., Asian Pac J Cancer Prev, 15 (3), 1085-1091, 2014.**

L'ultimo gruppo ci ricorda che ad oggi le conoscenze su alcune metalloproteasi, come la 19-21-23-27 e 28 non sono sufficienti per una catalogazione specifica, ma il loro ruolo ha suscitato grande

interesse clinico in diverse e importanti patologie. Per esempio è ormai noto il loro intervento nell'aneurisma aortico toracico e nell'angiopatia amiloide dei vasi cerebrali, dove rispettivamente la MMP 19 e MMP 12, siano persistentemente elevate (Amin et al, 2017).

Attualmente sono state individuate 25 MMPs dei vertebrati e 22 omologhe umane, oltre a diverse MMPs di invertebrati (Remacle et al, 2005). Il sequenziamento completo del genoma umano ha permesso di identificare il set completo delle MMPs prodotte dalle cellule umane. Sono stati identificati 24 geni distinti che codificano per le MMPs. Tali enzimi sono stati quindi rinominati e classificati in base alla loro struttura in 8 classi di cui 5 sono secrete e tre sono legate alla membrana cellulare.

I raggruppamenti più utilizzati dai ricercatori nel campo delle MMPs sono basati sulla specificità per i substrati e in parte della localizzazione cellulare delle MMPs, perché virtualmente tutte le proteine della matrice extracellulare potrebbero essere degradate dall'insieme delle MMPs (Sternlicht & Werb, 2001).

Struttura

Sebbene le MMPs possano avere azioni diverse, simile risulta essere la loro struttura. Le metalloproteinasi condividono una struttura a “**domini**” conservata. Sono infatti, come altri enzimi proteolitici, sintetizzati sotto forma di pre-pro-peptide e richiedono l'attivazione proteolitica che può essere extra-cellulare o intracellulare. L'attivazione proteolitica determina il rilascio del pro-peptide N-

terminale ed espone il sito attivo. La rimozione avviene dopo aver diretto la sintesi delle MMP al reticolo endoplasmatico. Questo dominio “pre” è seguito da un dominio pro-peptidico, il cui compito è di mantenere latente l'enzima fino alla sua distruzione o rimozione. Alla stabilità e all'attività dell'enzima partecipano anche degli ioni calcio (King, 2016; Nagase & Woessner, 1999).

La struttura base condivisa è formata dai seguenti domini sono:

- **Il pre-peptide N-terminale (peptide segnale)**
- **Pro-peptide**
- **Il dominio catalitico con un sito legante lo Zinco**
- **Il dominio C-terminale** di tipo emopexina

Il pre-peptide

Il pre-peptide (o peptide segnale) viene clivato dopo che ha svolto la sua funzione di sito d'inizio del rimaneggiamento del polipeptide nel reticolo endoplasmatico.

Il pro-peptide

Le MMPs sono espresse come pro-proteine, cioè zimogeni inattivi. Il pro-peptide, contiene una sequenza altamente conservata PRCGXPD, detto interruttore a cisteina (Cys), in cui il residuo di cisteina coordina lo Zn^{2+} nel dominio catalitico, che altrimenti sarebbe usato per la catalisi. Il pro-dominio viene rimosso in modo che l'enzima sia attivo.

Alcune MMPs hanno all'interno di questo dominio un sito di frammentazione simile quello usato di pro-ormoni in ormoni attivi, che quando scisso, attiva l'enzima. Le MMP23A e le MMP-23B includono un segmento transmembrana in questo dominio.

Strutturalmente, il gruppo tiolico di una Cys, lega l'atomo di Zn^{2+} ,

escludendo il legame con una molecola di acqua, mantenendo così, l'enzima latente. Lo spostamento del pro-dominio mediante alterazione conformazionale o per proteolisi, disturba l'appaiamento Cys-Zn e il gruppo tiolico è sostituito dall'acqua.

A questo punto l'enzima può scindere il legame peptidico dei suoi substrati. (Papageorgiou & Tousoulis, 2012)

Il dominio catalitico

Contiene il motivo HEXXHXXGXXH di legame con lo Zn^{2+} , in cui lo ione Zinco è chelato a tre residui di istidina (H), e una metionina conservata, formando il Met-turn, che sorregge la struttura del sito attivo attorno allo Zn^{2+} catalitico. La gelatinasi, come la MMP-2, incorporano moduli di fibronectina di tipo II inseriti immediatamente prima del motivo di legame con lo Zn del dominio catalitico (Trexler et al, 2003; Papageorgiou & Tousoulis, 2012).

Il dominio C-terminale

di tipo emopexina (β globulina, con struttura ad elica con 4 ripetizioni che mediano le interazioni proteina-proteina) collegato al dominio catalitico da una regione a cerniera flessibile, che può essere un peptide perno (hinge) o di legame (linker). Questo dominio è importante per il legame a:

- Particolari substrati
- Inibitori endogeni
- Recettori di superficie

Questa è la struttura della maggior parte delle metallo proteinasi, chiamata anche struttura archetipo, ad eccezione delle **MMP-7**

(matrilisina), **MMP-26** (endometasi/ matrilisina), dette MMPs minimali che mancano dei domini perno e di emopexina. Le due gelatinasi A e B (**MMP-2** e **MMP-9**) incorporano alla struttura archetipo, nel dominio catalitico, tre moduli di fibronectina II. Un gruppo di MMPs sono secrete in forma attivata. In questo gruppo, il dominio emopexina contiene, tra il pro-dominio e il dominio catalitico, un residuo di furina (Fu). La furina appartiene alla famiglia delle proteinasi intracellulari e consente l'attivazione intracellulare delle proteine secrete. Appartengono a tale gruppo la MMP-11, la MMP-28. La furina si trova anche nelle MMPs con inserto di Vitronectina, come la **MMP-21**.

Le MMPs di membrana (MT-MMPs) sono legate alla membrana cellulare. La struttura è caratterizzata dal dominio di emopexina con l'inserto di furina tra il propeptide ed il dominio catalitico, quindi tutte con attivazione intracellulare. Sulla base dell'ancoraggio alla membrana le MT-MMPs sono suddivise in tre gruppi.

Il primo gruppo è caratterizzato dalla presenza di un dominio transmembrana a singola catena dalla parte C-terminale ed un piccolo dominio citoplasmatico. A tale gruppo appartengono le **MMP-14**, **MMP-15**, **MMP-16**, **MMP-24**.

Il secondo gruppo, a cui appartengono le **MMP-17** e **MMP-25**, è legato alla membrana citoplasmatica dal glicosil-fosfatidil-inositolo (GPI).

Il terzo gruppo, manca del dominio di emopexina ed è legato alla membrana citoplasmatica da una ancora segnale dalla parte N-terminale a cui segue un piccolo peptide citoplasmatico. Inoltre, presenta dal lato C-terminale un peculiare schieramento di cisteina (Cysteina array) a cui segue un dominio immunoglobulinico IgC2. A

tale gruppo appartiene solo la MMP-23 distinta in **MMP-23A** ed **MMP-23B** codificate da 2 geni distinti ma con stessa sequenza aminoacidica (Trexler et al, 2003; Papageorgiou & Tousoulis, 2012).

Matrilisine 1 e 2 (MMP-7 e MMP-26)

Le matrilisine 1 (MMP-7) e 2 (MMP-26) mancano del dominio di emopessina sono quindi costituite solo dal dominio minino e vengono chiamate anche endometasi. La matrilisina 1 (MMP-7) è sintetizzata dalle cellule epiteliali ed è secreta apicalmente, agisce sui componenti della ECM e alcune molecole della superficie cellulare come la pro- α -defensina, Fas-Ligando, pro-tumor necrosis factor (TNF α) ed E-caderina.

La matrilisina 2 (MMP-26) è stata scoperta recentemente ed il 40% della sequenza amimoacidica è identica a quella della MMP-7.

E' espressa da alcuni tipi di cellule normali come quelle dell'endometrio ed in diversi tipi di carcinoma. E' in grado di digerire diversi componenti della MEC ed a differenza di molte altre MMPs è immagazzinata in grande quantità all'interno delle cellule. Svolge un ruolo fondamentale nell'infiammazione ed è espressa

in grande quantità nei macrofagi e nei leucociti polimorfonucleati (Figura 21).

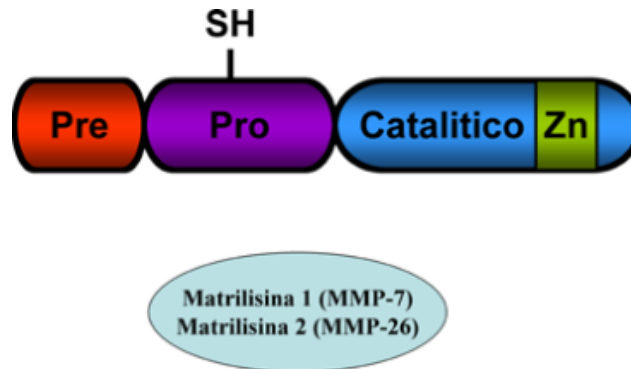


Figura 21: Struttura base delle metallo proteinasi (dominio minino) adattata dalla referenza Egeblad M., Werb Z.: New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat. Rev. Cancer 2002; 2: 161-174.

Collagenasi 1,-2,-3 (MMP-1, MMP-8, MMP-13), collagenasi 4 (MMP-18 da *Xenopus laevis*)

La collagenasi 1 (MMP-1), il primo componente della famiglia delle MMP, è stata purificata dalla coda del girino in cui la collagenolisi è richiesta per digerire il collagene della coda durante la metamorfosi dell'anfibio. Il cDNA della MMP-1 umana clonato e sequenziato è stato ottenuto da fibroblasti della pelle. La MMP-1 umana è prodotta come due differenti pro-enzimi glicosilati di 52 kDa e 57 kDa dai quali dopo il taglio proteolitico del pro-peptide si formano due proteinasi attive di 42 e 47 kDa rispettivamente.

E' espressa in molti tipi di cellule normali in coltura (cheratinociti, fibroblasti, cellule endoteliali, monociti, macrofagi, epatociti, condrociti) ed in molti tipi di cellule tumorali. Taglia molti componenti della MEC (collageni tipo I, II, III, VII,

VIII e X, inibitori delle serine proteasi, e della $\alpha 2$ macroglobulina), ma non i principali componenti della membrana basale.

L'espressione della MMP-1 è stata evidenziata in molti processi fisiologici (sviluppo embrionale, rimarginazione delle ferite) e

patologici (ulcere cutanee croniche) e in diversi tipi di tumori (carcinoma mammario, coloretale, gastrico, ovarico, esofageo, melanoma maligno, adenocarcinoma del pancreas).

La collagenasi 2 (MMP-8), nota anche come collagenasi neutrofila è sintetizzata dai neutrofili durante la loro maturazione nel midollo osseo, è immagazzinata nei granuli intracellulari ed è rilasciata in risposta a stimoli extra-cellulari (17). La MMP-8 è caratterizzata da sei potenziali siti di N-glicosilazione, viene secreta sia come forma non glicosilata di 55 kDa che come forma glicosilata di 75 kDa. E' espressa dai condrociti nella cartilagine articolare, dalle cellule mononucleari fibroblasti-like nella sinovia reumatoide, dalle cellule epiteliali bronchiali e dai monociti durante le bronchiti (Trexler et al, 2003; Papageorgiou & Tousoulis, 2012).

E' presente in molti tipi di cellule normali in coltura (condrociti, fibroblasti della sinovia reumatoide, fibroblasti gengivali, cheratinociti della mucosa orale) e cellule del melanoma.

I substrati principali della MMP-8 sono i collageni fibrillari; taglia il collagene tipo I in modo significativamente più efficiente rispetto al collagene tipo III. Può regolare l'infiammazione tagliando ed attivando le chemiochine.

La MMP-8 è coinvolta in molti processi sia fisiologici (cartilagine articolare, maturazione dei neutrofili) e nel carcinoma ovarico.

La collagenasi 3 (MMP-13) è stata clonata da cellule di carcinoma umano della mammella (20). E' secreta come una glicoproteina di 60 kDa ed è attivata ad una forma di 48 kDa (attraverso una forma intermedia di 50 kDa) da plasmina, stromelisina, MMP-2 ed MT1-MMP.

Rispetto alle altre MMPs ha un pattern di espressione piuttosto ristretto ed una specificità di substrato molto vasta. Agisce sui collagene fibrillari (tipo I, II, III), gelatina, collagene tipo IV, IX, X e XIV, tenascina C, fibronectina, aggrecan, versican, fibrillina-1 ed osteonectina.

Inoltre, la MMP-13 può inattivare alcune chemiochine come i monociti *chemoattractant protein 3* (MCP-3) ed il *fattore-1 derivato della cellule stromali* (SDF-1) ed infine sembra essere coinvolta nell'attivazione del pro-TGF β 3.

La sua azione si manifesta in poche situazioni fisiologiche in cui è coinvolto il rapido ed effettivo rimodellamento dei collagene della matrice la nascita, riparazione delle ferite della pelle fetale e delle gengive.

Agisce in situazioni patologiche caratterizzate dalla distruzione dell'architettura

Del collagene tissutale (cartilagine osteoartritica, sinovia reumatoide, ulcere cutanee croniche, ulcerazioni intestinali, periodontiti croniche, aterosclerosi ed aneurisma dell'aorta).

La enorme capacità proteolitica della MMP-13 (collagenasi 3) suggerisce che si tratta di una proteinasi potente e potenzialmente distruttiva, pertanto la sua espressione, in situazioni fisiologiche, è rigidamente controllata.

La collagenasi 4 (MMP-18 da *Xenopus laevis*) non è stata identificata nell'uomo (Trexler et al, 2003; Papageorgiou & Tousoulis, 2012; Yadav et al, 2014).

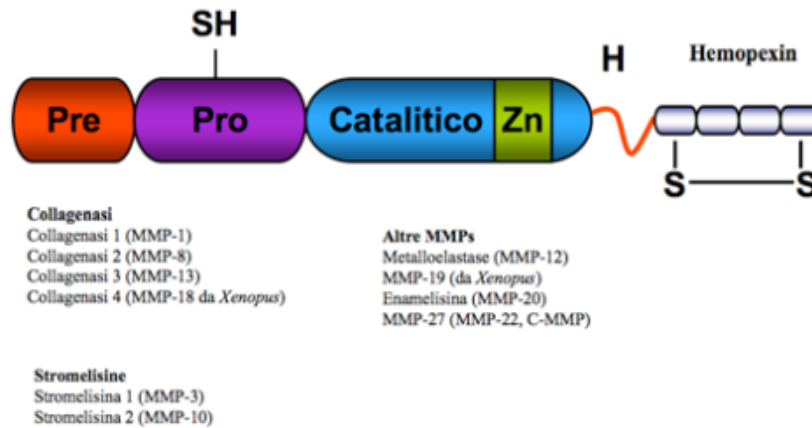


Figura 22: Struttura archetipo delle metalloproteinasi adattata dalla referenza Egeblad M., Werb Z.: New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat. Rev. Cancer 2002; 2: 161-174.

Stromelisine -1, -2, -3 (MMP-3, MMP-10, MMP-11)

La stromelisina 1 (MMP-3) e la stromelisina 2 (MMP-10) hanno una specificità

Di substrato simile. Tuttavia la MMP-3 presenta efficienza proteolitica migliore della MMP-10, ed oltre che sui componenti della MEC, agisce su diverse proMMPs. In particolare l'azione litica della MMP3 sulla MMP-1 è critica per la formazione della MMP-1 completamente attivata.

La stromelisina 3 (MMP-11) è caratterizzata da attività litica molto debole verso i

componenti della MEC ed è secreta dalle cellule in forma attiva. (Yadav et al, 2014)

Gelatinasi A e B (MMP-2 e MMP-9)

Le gelatinasi o collagenasi tipo IV, MMP-2 (gelatinasi A) e MMP-9 (gelatinasi B) sono caratterizzate dalla presenza di tre moduli di

fibronectina tipo II che permettono lo svolgimento e la completa degradazione della tripla elica del collagene.

I geni che codificano per le gelatinasi e la sequenza dei rispettivi promotori sono stati caratterizzati, pur essendo molto simili le due gelatinasi presentano sostanziali differenze nella regolazione dell'espressione, della glicosilazione, dell'attivazione del pro-enzima e della specificità per i substrati.

La MMP-2 è una proteina di 72 kDa non glicosilata; è espressa nei fibroblasti, nelle cellule endoteliali, nelle cellule epiteliali e nelle cellule trasformate. Nel siero circola come monomero. La MMP-9 ha peso molecolare di 92 kDa, contiene 2 siti N-glicosilati nel pro-peptide e nel dominio catalitico ed alcuni glicani O-linked.

E' espressa nei leucociti, nei periciti (cellule mesenchima-like di forma allungata, situate vicino alla parete esterna delle venule, relativamente indifferenziate), nelle cellule endoteliali e nelle cellule trasformate.

Nel plasma circola come monomero o complessata e può formare dimeri e/o multidimeri. (Yadav et al, 2014; Trexler et al, 2003)

La caratteristica peculiare delle MMP-2 e -9 è che sono in grado di digerire rapidamente la gelatina (collageni denaturati) con l'aiuto dei tre repeats di fibronectina che si legano alla gelatina/collagene. Digeriscono l'elastina, i collageni tipo IV, V, laminina, core proteine ed altri componenti della matrice extra-cellulare

e della membrana basale.

I substrati delle gelatinasi, inoltre, comprendono anche proteinasi, proteinasi inibitori, fattori della coagulazione, molecole chemotattiche, fattori di crescita latenti, proteine leganti i fattori di

crescita, recettori di membrana, molecole di adesione ed anche substrati intra-cellulari.

La specificità dei substrati delle MMP-2 e -9 è simile ma non identica.

La differenza principale è la capacità della MMP-2 di degradare il collagene nativo tipo I. Alcuni substrati mostrano una selettività verso MMP-2 di circa 200 volte maggiore rispetto alla MMP-9. La differenza nella specificità dei substrati è stata attribuita al subsito S2 del sito catalitico, dove la MMP-9 contiene acido aspartico e la MMP-2 contiene acido glutammico (Trexler et al, 2003; Papageorgiou & Tousoulis, 2012).

La MMP-2, ma non la MMP-9, digerisce il collagene tipo I, II e III allo stesso modo delle collagenasi. L'attività della MMP-2 in soluzione è molto più debole di quella della MMP-1 (collagenasi 1), tuttavia, siccome la pro-MMP-2 è reclutata alla superficie cellulare ed è attivata dalle metalloproteinasi di membrana, è probabile che la MMP-2 possa esprimere una ragionevole attività litica sulla/o vicino alla superficie cellulare.

La MMP-2 intracellulare dei cardiomiociti digerisce la troponina I, la catena leggera della miosina e la poly(ADPribose) polimerasi. La regolazione della espressione delle due gelatinasi è diversa.

La MMP-2 è costituzionalmente espressa con pochi e modesti meccanismi di down and-up regulation nelle varie condizioni. La MMP-9 è altamente inducibile ed è sotto il controllo dei fattori crescita, chemiochine ed altri segnali stimolatori.

Entrambe le gelatinasi sono coinvolte in molti processi fisiologici e patologici. Sono richieste nei processi invasivi durante la riproduzione, crescita, sviluppo, mobilitazione dei leucociti,

infiammazione, rimarginazione delle ferite, angiogenesi. Aumento dell'attività delle gelatinasi è stata osservata nelle infiammazioni, nelle malattie infettive, nei processi degenerativi del cervello, nelle malattie vascolari. Recenti studi hanno dimostrato che: a) la MMP-2 è coinvolta nelle disfunzioni cardiache e b) la MMP-9 ha un ruolo protettivo nei processi di aterosclerosi infatti limita la crescita delle placche e ne aumenta la stabilità.

La MMP-2 e la MMP-9 sono coinvolte in molte tappe dello sviluppo e della progressione tumorale: crescita del tumore primario, angiogenesi, extravasazione ed intravasazione delle cellule neoplastiche, migrazione, invasione delle cellule metastatiche nell'organo secondario, inizio e mantenimento della crescita tumorale nel sito metastatico. (Trexler et al, 2003; Papageorgiou & Tousoulis, 2012)

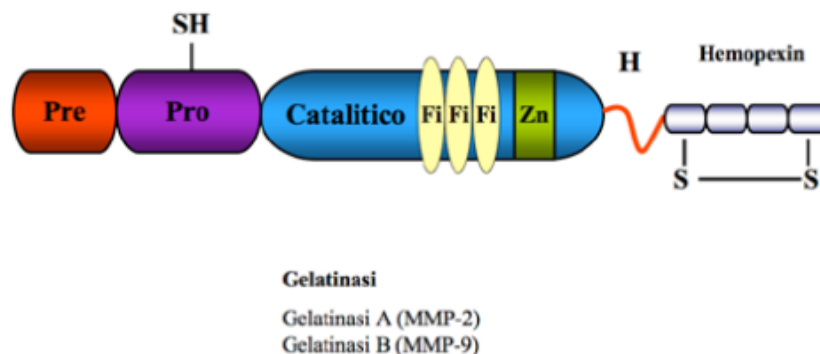


Figura 23. Struttura delle metalloproteinasi leganti la gelatina adattata alla referenza Egeblad M., Werb Z.: New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat. Rev. Cancer 2002; 2: 161-174.

MMPs Transmembrana (MT-MMPs)

Le MT-MMPs di tipo I sono le MMP-14, -15, -16, e -24 (ridenominate MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP e MT5-MMP rispettivamente), attivano la proMMP-2 e digeriscono diverse proteine della matrice extra-cellulare.

In particolare la MT1-MMP (MMP-14) presenta attività gelatinolitica sui collageni

Tipo I, II e III. I topi MT1-MMP *null* mostrano, dopo la nascita, anomalie dello sviluppo scheletrico dovute molto probabilmente alla mancanza dell'attività collagenolitica (Holmbeck et al 1999). Inoltre la MT1-MMP svolge un importante ruolo nella angiogenesi (Sekine et al, 2001). La MT5-MMP è specifica del cervello ed è espressa prevalentemente nel cervelletto (29). Le MT-MMPs ancorate alla membrana cellulare dal glicosil-fosfatidil-inositolo (GPI-anchored) sono la MMP-17 e la MMP-25 (ridenominate MT4-MMP ed MT6-MMP).

La MT4-MMP è l'unica metalloproteinasi legata alla membrana cellulare che non attiva la proMMP-2. La MT6-MMP (MMP-25) è espressa quasi esclusivamente nei leucociti circolanti, nell'astrocitoma anaplastico e nel glioblastoma, ma è assente nei meningiomi (Velasco et al, 2000).

Il tipo II delle MT-MMPs include solo una metalloproteinasi la CA-MMP nota anche come MMP-23. La MMP-23, detta anche cisteina array MMP, è espressa prevalentemente nei tessuti riproduttivi (14). L'enzima manca della cisteina nel predominio, e del dominio hemopessina.

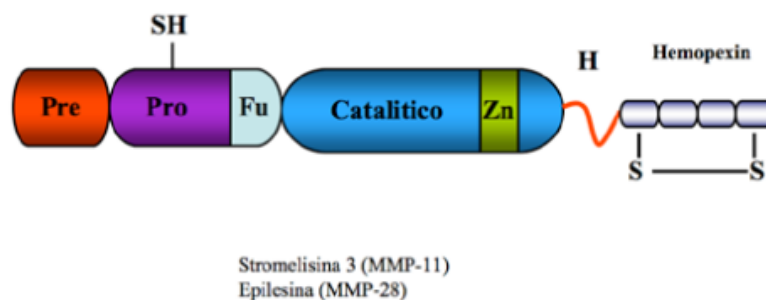


Figura 24: Struttura delle MMPs secrete con inserto di furina adattata alla referenza Egeblad M., Werb Z.: New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat. Rev. Cancer 2002; 2: 161-174.

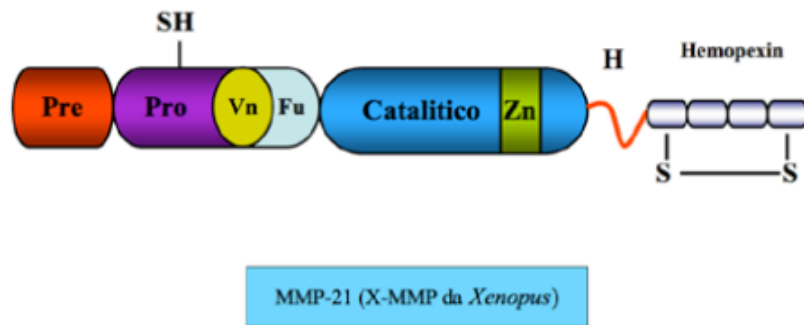


Figura 25: Struttura delle MMPs con inserto di Vitronectina adattata alla referenza Egeblad M., Werb Z.: New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat. Rev. Cancer 2002; 2: 161-174.

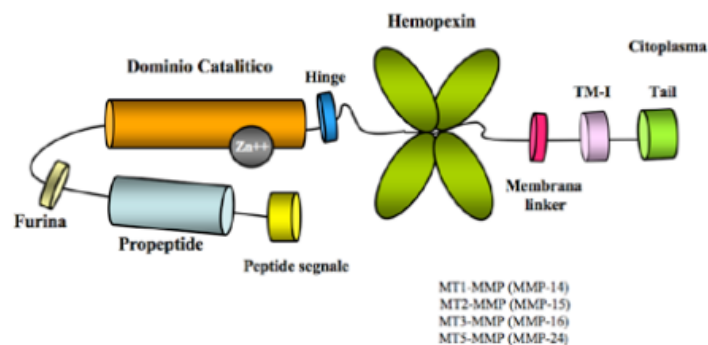


Figura 26: Struttura delle MMPs trans-membrana (MT-MMPs) Tipo I adattata alla referenza Folgueras A.R., Pendás A.M., Sánchez L.M., López-Otín C: Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. Int. J. Rev. Biol. 2004; 48: 411-424.

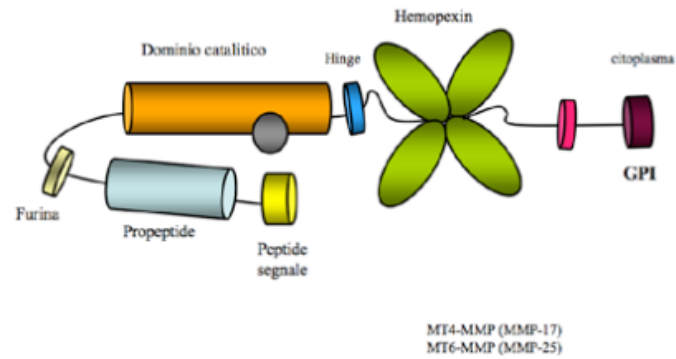


Figura 27: Struttura delle MMPs trans-membrana legate con Glicosil-Fosfatidil-Inositolo (GPI) adattata alla referenza Folgueras A.R, Pendás A.M., Sánchez L.M., López-Otín C: Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. Int. J. Rev. Biol. 2004; 48: 411-424.

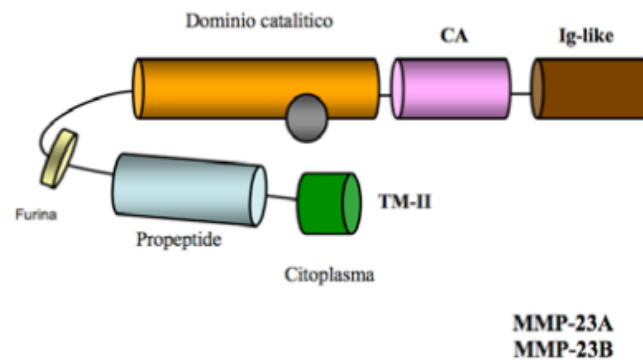


Figura 28: Struttura delle MMPs trans-membrana Tipo II (cisteina array) adattata alla referenza Folgueras A.R, Pendás A.M., Sánchez L.M., López-Otín C: Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. Int. J. Rev. Biol. 2004; 48: 411-424.

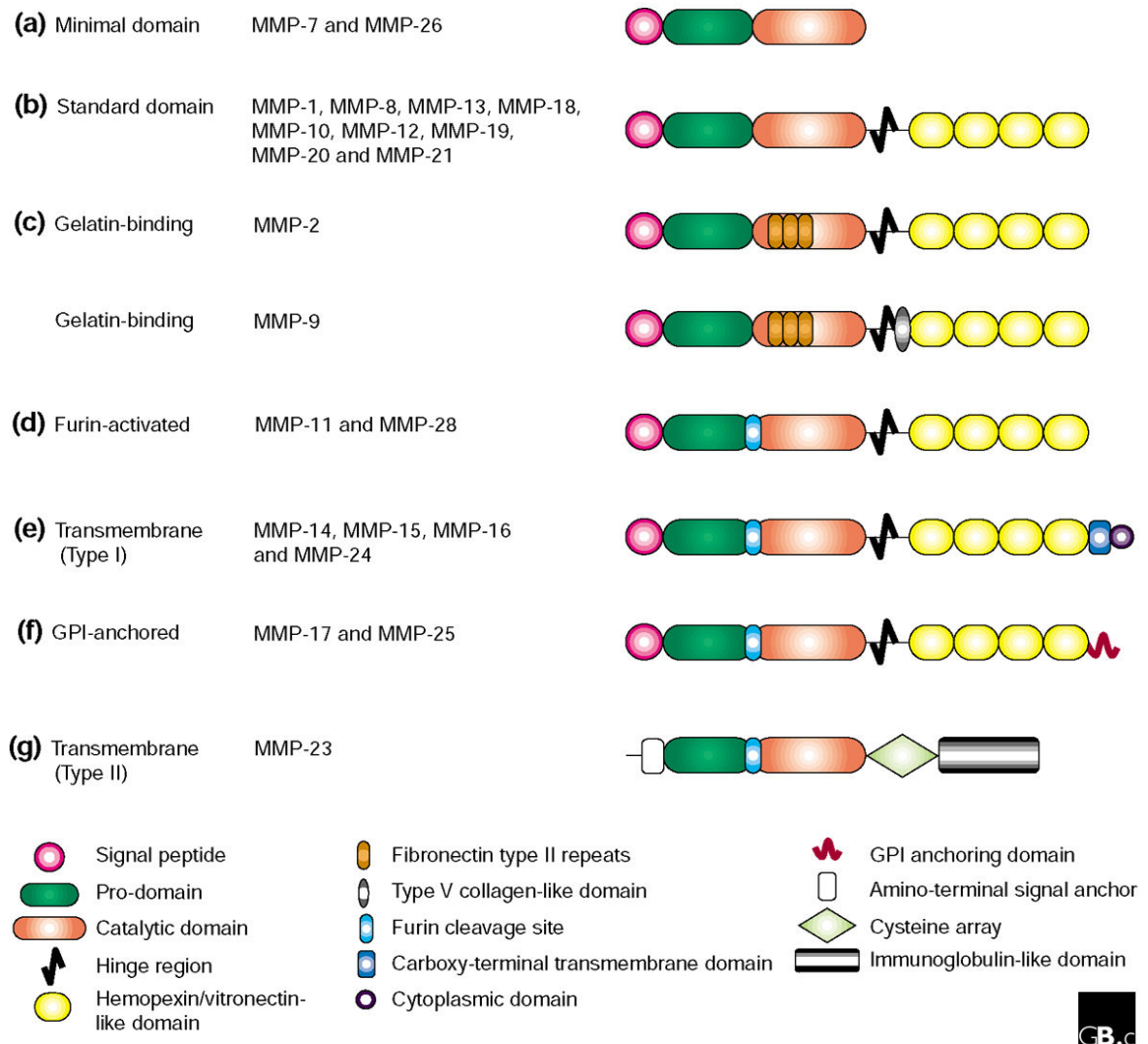


Figura 29: schema riassuntivo delle MMPs tratto da Robert PT Somerville et al Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. Genome Biology 2003, 4:216.

Meccanismo di azione delle metalloproteinasi

Affinchè le metalloproteinasi possano svolgere la propria funzione, sia fisiologica che patologica, risulta indispensabile che tali enzimi vengano sottoposti ai raffinati sistemi di regolazione sia a livello trascrizionale che post trascrizionale e, a livello proteico, subiscano l'azione di loro specifici attivatori ed inibitori, azione questa svolta in particolare da una serie di citochine. Inoltre, la loro azione risulta essere influenzata dalla localizzazione delle stesse proteasi a livello di

superficie cellulare (Sternicht e Werb, 2001).

Poiché le varie specificità delle metalloproteinasasi tendono a sovrapporsi, l'azione biologica di ogni singola MMPs è dettata dai diversi pattern differenziali di espressione. Semplificando possiamo affermare che le differenze temporali, spaziali e di inducibilità sono responsabili della specificità di azione. Con l'eccezione della MMP-2, che risulta controllata attraverso un unico meccanismo di attivazione enzimatica e dalla stabilizzazione post-trascrizionale dell mRNA, è a livello trascrizionale che avviene la maggior parte dei meccanismi di regolazione (Sternicht e Werb, 2001).

Da un punto di vista genico l'espressione delle MMPs può subire una *up o down regulation* da parte degli esteri del forbolo, della componente proteica della matrice extracellulare (ECM). Infatti quest'ultima può subire stress cellulare e variazioni, sia di forma che di interazioni tra la stessa matrice e la cellula che tra le varie cellule (Nagase & Woessner, 1999; Sternicht & Werb, 2001)

Ancora, la loro espressione è influenzata da diverse citochine e fattori di crescita. Tra questi ultimi ricordiamo le varie interleuchine (IL) e interferoni (IFN) il vascular endothelial growth factor (VEGF), il fattore di crescita epiteliale (EGF), il tumor necrosis factor alfa e beta (TNF α e TNF β), il Trasforming growth factor beta (TGF- β) e l'extra cellular matrix β Metalloproteinase Inducer, il Platelet Derived Growth Factor (PDGF) (McLennan et al, 2000; Sternicht e Werb, 2001).

Ancora un importante meccanismo di regolazione si verifica a livello secretorio, dove in particolare le MMP 8 e 9, vengono sintetizzate a livello midollare dai granulociti ed in seguito vengono sottoposte ad immagazzinamento nei granuli contenuti nei neutrofili circolanti. Tali

granuli vengono poi stimolati al rilascio da parte dei mediatori della flogosi (Sternicht e Werb, 2001).

L'attivazione delle metalloproteasi latenti

Come molte proteasi, anche le metalloproteinasi sono dapprima sintetizzate come zimogeni inattivati. Il loro meccanismo di attivazione differisce poi a seconda che avvenga *in vivo* o *in vitro*. Se *in vitro* assistiamo ad una attivazione tramite proteinasi o non proteinasi, come i composti mercuriali, *in vivo* assistiamo all'attivazione tramite proteinasi batteriche o tissutali o plasmatiche. In particolare un importante ruolo di attivazione viene svolto dal sistema uPA/plasmina, in particolare per quanto riguarda il meccanismo di azione nell'attivazione della gelatinasi B. A prescindere dalla tipologia di metalloproteinasi, la rottura delle interazioni tra Cys-Zn²⁺ (Cystein switch) risultano essere sempre presenti ed indispensabili (King, 2016; Nagase & Woessner, 1999; Sternicht & Werb, 2001).

Attivazione delle collagenasi

L'attivazione completa delle collagenasi richiede la interazione dell'urochinasi attivatore del plasminogeno e della stromelisina 1 (MMP-3). L'urochinasi converte il plasminogeno in plasmina (serina proteasi attivata) che attiva parzialmente la pro-collagenasi e converte la proMMP-3 in MMP-3 (stromelisina); quest'ultima agisce sulla collagenasi parzialmente attivata trasformandola nella forma completamente attivata.

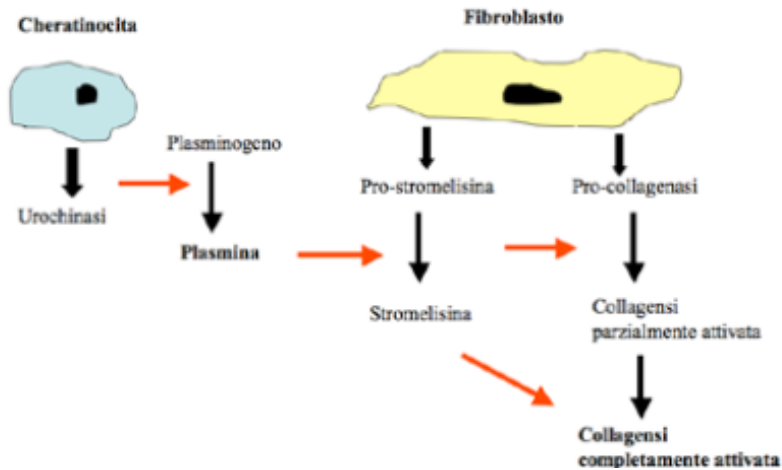


Figura 30: Meccanismo di attivazione delle collagenasi. La plasmina e la stromelisina cooperano nella produzione della collagenasi completamente attivata. La urochinasi prodotta dai cheratinociti converte il plasminogeno in plasmina (una serina proteasi attivata). La plasmina converte la pro-stromelisina in stromelisina e la pro-collagenasi in collagenasi parzialmente attivata grazie al taglio del pro-peptide.

La stromelisina può convertire la collagenasi parzialmente attivata nella forma completamente attivata. Adattata alla referenza He C., Wilhelm S.M., Pentland A.P., Marmer B.L., Grant G.A., Eisen A.Z., Goldberg G.I.: Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989; 86: 2632- 2636.

Particolarmente interessante risulta essere il meccanismo di attivazione della MMP-2 o Gelatinasi A che si realizza a livello della superficie cellulare con un meccanismo mediato dalle MT1-MMP, MT2-MMP.

La proMMP-2 non è prontamente attivata, proMMP-2 viene attivata principalmente sulla superficie cellulare.

Per comprendere la complessa attivazione della Gelatinasi A (MMP-2), dobbiamo innanzitutto prendere in considerazione una ProMT-MMP nel comparto intracellulare. Questo proenzima è attivato, durante il trasporto verso la superficie della cellula o direttamente sulla membrana cellulare, da variazioni conformazionali non proteolitiche o da molecole quali le serina proteasi furina-like (a

livello intracellulare) o la plasmina (a livello di superficie). Una volta attivata, la MT-MMP si lega al dominio N-terminale di una molecola TIMP-2 e viene così inibita nuovamente. Il ruolo dominante del TIMP-2 *in vivo* è appunto l'attivazione della ProMMP-2 (Wang et al., 2000; Sternlicht & Werb, 2001).

Il dominio C-terminale del TIMP-2 funge invece da recettore per il dominio emopexina di una ProMMP-2. Si viene così a costituire un complesso trimolecolare (MT-MMP inibita + TIMP-2 + ProMMP-2). Poi, una MT-MMP, libera e attiva, rimuove gran parte del pro-peptide della ProMMP-2 attivandola parzialmente. La porzione restante del pro-peptide sarà rimossa da un'altra MMP-2 a livello di superficie cellulare, per produrre una Gelatinasi A completamente attiva e matura. L'MMP2 matura potrà essere poi rilasciata dalla superficie cellulare, o essere bloccata da un'altra MMP2-*docking* di superficie. Potrà anche essere inibita da un'altra molecola TIMP o lasciata in uno stato attivo che dipenderà dal locale rapporto molare MMP:TIMP (Sternlicht e Werb, 2001).

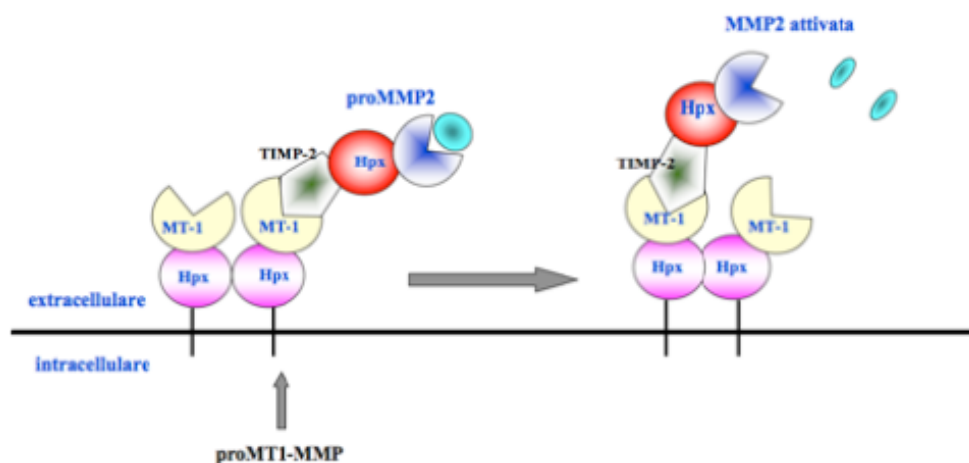


Figura 31: Meccanismo di attivazione della proMMP-2 sulla superficie cellulare.

Attivazione della gelatinasi A (MMP-2) dalla MT1-MMP. La MT1-MMP è attivata all'interno della cellula dalla furina e si localizza sulla superficie cellulare attraverso il dominio transmembrana. La MT1-MMP, attraverso l'interazione con il dominio hemopexin (Hpx) forma dei dimeri. Il dominio N-terminale del TIMP-2 si lega al sito catalitico della MT1-MMP (giallo). Il complesso MT1-MMP-TIMP-2 recluta la proMMP-2 attraverso l'interazione del dominio carbossil-terminale del TIMP-2 con il dominio hemopexin della proMMP-2. Il "recettore" MT1-MMP forse trasporta la proMMP-2 chiusa al sito "catalitico" della MT1-MMP, che taglia il pro-dominio della MMP-2 ed attiva l'enzima. Basata sulla referenza Itoh Y., Takamura A., Ito N., Maru Y., Sato H., Suenaga N., Aoki T., Seiki M.: Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion, EMBO J. 2001; 20: 4782-4793.

Gli inibitori delle metalloproteasi

In tutti gli esseri viventi, l'attività proteolitica è sotto rigido ed accuratissimo controllo allo scopo di evitare danni all'organismo. Per tale motivo, l'azione proteolitica è tipicamente regolata a molti livelli comprendenti trascrizione, secrezione, attivazione ed inibizione degli enzimi.

I principali inibitori delle metalloproteinasi sono gli inibitori tissutali delle

matrix-metalloproteinasi (TIMPs). Il più importante meccanismo di inibizione dell'attività delle metalloproteinasi è svolto dai TIMPs (Tissue Inhibitors MetalloProteinase).

Essi sono una famiglia di 4 proteine, il cui peso molecolare varia dai 20 ai 29 kDa. In grado di indurre una inibizione reversibile della metalloproteinasi con un rapporto stechiometrico 1:1, attraverso un meccanismo di interazione del loro dominio N-terminale con uno specifico sito catalitico della MMP interessata (Cieplak & Strongin, 2017; Sternlicht & Werb, 2001).

Nei vertebrati sono stati identificati 4 TIMPs (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4) e la loro espressione è regolata durante lo sviluppo ed il rimodellamento tissutale. I TIMP-1, -2 e -4 sono secreti mentre il TIMP-3 è ancorato alla MEC

Conosciamo 4 tipologie di TIMPs

- I. TIMP-1
- II. TIMP-2
- III. TIMP-3
- IV. TIMP-4

L'attività dei vari TIMPs si differenzia tra di loro grazie ad una certa specificità di azione. Infatti, ad esempio, TIMP-3 risulta essere particolarmente potente e selettivo nell'inibizione di MMP-9. (Sternlicht & Werb, 2001)

Ancora, oltre alla già accennata azione inibente, le TIMPs sono in grado di svolgere un'azione favorente sulla crescita cellulare. Tipico esempio ne è TIMP-1, utilizzato in farmacologia per la sua azione di promotore dell'attività di sviluppo degli eritrociti. Infine ne ricordiamo la capacità sia di promuovere l'apoptosi che di bloccare segnali mitogeni.

Se per i TIMPs si parla di azione locale, ovvero a livello tissutale, discorso diverso avviene per le MMPs circolanti. L'inibizione delle MMPs circolanti avviene per opera delle alfa-2 macroglobulina, potente proteina plasmatica prodotta sia a livello epatico che per opera di macrofagi e fibroblasti. Oltre all'azione inibente sulle metalloproteinasi circolanti, è responsabile dell'inibizione della fibrinolisi per diretta inibizione della plasmina e callicreina (Nagase & Woessner, 1999; Sternlicht & Werb, 2001).

Terminiamo citando una proteina "Cystein rich", ossia la proteina RECK. Tale proteina, normalmente ancorata alla membrana citoplasmatica. La proteina RECK ha mostrato azione inibente a carico di diversi membri della famiglia delle MMPs, in particolare a carico di MMP-2 e MMP-9.

La sua importanza può essere facilmente dedotta dal fatto che una sua deficienza a livello di sviluppo embrionale porta a rapida morte per anomalie vascolari incompatibili con la vita (Folkman, 2008; Takagi et al., 2005)

Localizzazione, catabolismo e clearance delle MMPs

E' ormai un dato accertato che, attraverso la proteolisi cellulare, si creano, si concentrino e poi vengano cancellati, numerosi segnali cellulari in prossimità della membrana cellulare. Non sfuggono a tale meccanismo le MMPs che, si localizzano sulla superficie cellulare grazie a diversi meccanismi

- I. Legame MMPs al recettore sulla superficie di membrana
- II. Espressione delle MT_MMPs legate alla membrana

- III. Presenza sulla superficie di membrana di specifici recettori in grado di attivare le MMPs (es ne sono recettori per enzimi come il plasminogeno, la trombina, l'elastasi)
- IV. Una importante concentrazione di MMP strale molecole della matrice extracellulare (ECM)

Esempi classici di localizzazione sulla superficie cellulare dell'attività enzimatica sono gli ancoraggi delle MMps al GPI o i recettori di superficie "docking".

Infine ulteriore meccanismo che permette alla MMPs di legarsi alla superficie cellulare è un ancoraggio tramite i loro substrati. Esempio ne è la proMMP-9 che si lega, tramite le catene $\alpha 2$ del collagene di tipo IV, a diverse cellule, in attesa di una sua attivazione (Sternlicht & Werb, 2001).

Appare infine logico che, dopo aver esplicitato la loro azione, l'organismo sia in grado di provvedere ad inattivarle ed ad eliminarle fisicamente (*clearance*).

Poco se ne conosce circa il meccanismo. Possibili inibizioni possono essere date da

- I. La rimozione del dominio emopexina può generare nuovi enzimi bloccandone i precedenti;
- II. Sempre la rimozione del dominio emopexina può far perdere la capacità di localizzare i suoi specifici recettori a carico della superfice cellulare;
- III. Importante ruolo sembra essere quello della trombospondina-2 (TS-2). Infatti si è notato che topi che presentano una deficienza di TS-2 mostrano elevati livelli di MMP-2 e di

conseguenza sviluppano importanti anomalie sia del connettivo che dei fibroblasti (Sternlicht & Werb, 2001).

Substrati delle MMPs

Come abbiamo già accennato l'attività delle MMPs non è substrato-specifica, infatti spesso assistiamo ad una sovrapponibilità di azione.

Classico esempio è rappresentato dalle Gelatinasi A e B, dove entrambe svolgono una loro azione di degradazione del collagene e della gelatina della membrana basale, tuttavia si differiscono per una specificità di azione diversa. Infatti la Gelatinasi A mostra una maggior specificità di azione verso la fibronectina e la laminina, al contrario della Gelatinasi B che mostra tale specificità di azione rivolta verso il collagene IV e V (Sternlicht & Werb, 2001).

Oltre all'azione di degradazione dei componenti della ECM, le MMPs svolgono una loro azione anche tramite la liberazione, e quindi attivazione, o inibizione, di diverse molecole bioattive. Ancora alla loro azione può favorire meccanismi di segnalazione che governano l'omeostasi extracellulare (Overall & Kleifeld, 2006).

Terminiamo parlando del ruolo rivestito da questi enzimi nell'emostasi, dove hanno azione fibrinolitica e, parlando delle MMPs 12,13 e 14, sono in grado di inattivare il fattore XII (Fattore di Hageman).

In oncologia si è visto recentemente che le MMPs utilizzano l'aggregazione piastrinica per poter legarsi alle cellule neoplastiche e vincere sia il flusso ematico che la sorveglianza del sistema immunitario. In questa maniera riescono a favorire il processo metastatico (Yoon et al, 2006)

CAPITOLO SEI

VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF)

6.1 Storia del VEGF

Il *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) è un peptide identificato e successivamente sequenziato negli anni 80 che possiede fondamentalmente la duplice funzione sia di regolazione della permeabilità vascolare che la stimolazione dell'angiogenesi. Tra le varie molecole che regolano questi fenomeni, il VEGF è attualmente quello maggiormente studiato (Gasperini e Longo, 2005; Papetti e Herman, 2002).

Circa la scoperta di questa molecola, diversi ed indipendenti gruppi di ricerca contribuirono. Nel 1983 Senger e collaboratori riportarono l'identificazione, studiando una coltura lineare cellulare in laboratorio, di un fattore in grado in grado di modificare la vascolarizzazione cutanea. Gli stessi Autori proposero il termine di VPF (*Vascular Permeability Factor*) per identificarlo (Ferrara, 2009).

Nel 1989, sempre il gruppo di studio di Napoleone Ferrara e Henzel, mentre lavorava sulle colture della ghiandola pituitaria di bovino, isolò un fattore mitogeno endoteliale, da essi identificato con il termine VEGF (Ferrara, 2009).

Una volta effettuati gli studi molecolari, eseguiti in maniera indipendente da ciascun gruppo di lavoro, si arrivò alla conclusione che VPF e VEGF, insieme anche la Vasculotropina, furono identificati come coincidenti e quindi si rinominò la sostanza come VEGF-A (Ferrara, 2002; Folkman, 2008; Ferrara 2009).

Gli studi compiuti negli anni 90 chiarirono una domanda fondamentale, ossia come il VEGF svolgesse un ruolo chiave nella regolazione del processo angiogenico *in vivo*.

La prima evidenza che l'espressione di VEGF si correli alla crescita dei vasi sanguigni deriva da uno studio in cui si evidenziava che il VEGF mRNA è espresso a livelli molto bassi nelle cellule granulose avascolari nell'ovario, mentre è iperespresso nel corpo luteo, riccamente vascolarizzato (Ferrara, 2009).

Ulteriore conferma avvenne nel 1992, studiando i livelli di VEGF mRNA presenti nella fitta trama vascolare del glioblastoma. Anche in questo caso, due gruppi di studio indipendenti confermarono il ruolo di questa molecola come potenziale regolatore dei processi angiogenici (Ferrara, 2009).

Anche oggi il VEGF, nonostante la scoperta di nuove ed interessanti molecole pro-angiogeniche, ha mantenuto il suo ruolo chiave, sia in ambito fisiologico che patologico. Inoltre, oltre ad essere valutato per scopi diagnostici, rivela notevole importanza sia da un punto di vista prognostico che come target terapeutico (Gasperini e Longo, 2005).

6.2 La famiglia del VEGF

La famiglia del VEGF è composta da una serie di molecole glicoproteiche, di circa 34-46 kDa, presenti (ad eccezione di VEG_E e T:F) nel genoma dei mammiferi le cui funzioni non si esauriscono solo alla vasculogenesi, bensì intervengono nell'angiogenesi, sia fisiologica che patologica. Tramite cristallografia ai raggi X il VEGF viene inserito fra le proteine appartenenti alla superfamiglia dei fattori di crescita cisteinici.

Secondo Folkman la famiglia è composta da almeno sette membri (Folkman, 2008)

- 1. VEGF-A**
- 2. VEGF-B**
- 3. VEGF-C**
- 4. VEGF-D**
- 5. PlGF (Placental Growth Factor)**
- 6. VEGF-E**
- 7. T.F. o VEGF-F**

6.3 Funzioni biologiche del VEGF

VEGF-A, molecola meglio caratterizzata e studiata è principalmente coinvolto nella regolazione dell'angiogenesi, mentre VEGF-C e VEGF-D sono coinvolti nella linfoangiogenesi. Il VEGF-E è la proteina codificata dal gene del parapox Orf virus, attiva solo il VEGFR2 ed è un potente stimolatore di angiogenesi; il PlGF induce angiogenesi *in vivo* ed è principalmente espresso nella placenta e nelle neoplasie (Folkman, 2008; Mehta e Dhalla, 2013).

VEGF-A: la sua azione si svolge quasi esclusivamente a livello delle cellule endoteliali di arterie, vene e vasi linfatici, ossia strutture in cui riscontriamo i suoi recettori. Principalmente induce proliferazione, migrazione e differenziazione delle cellule endoteliali per azione diretta. Tuttavia si riconoscono diverse altre azioni: in particolare Folkman pone l'accento sulla capacità di tale molecola di alterare la permeabilità dei vasi, attraverso diversi meccanismi (aumento delle fenestrature vasali, aumento del flusso di calcio).

Tale alterazione vasale porta al passaggio del fibrinogeno nella ECM (matrice extra-cellulare), dando vita al substrato ottimale per la neoangiogenesi. Ancora, recenti studi, lo vedono implicato, attraverso l'espressione di alcuni fattori come il PAI-1 (importante inibitore della fibrinolisi), nella regolazione della coagulazione (Folkman, 2008).

Ancora si segnala la capacità del VEGF-A di rallentare, contrastando il fenomeno apoptotico, la morte delle cellule endoteliali. Tale azione riflette una stabilizzazione della rete vascolare che si è andata a realizzare. Ancora, sempre una stabilizzazione della rete vasale, è resa possibile dall'azione delle molecole di adesione VCAM-1 e ICAM-1 che, upregulate dal VEGF-A, sono iperesprese (Folkman, 2008).

L'azione del VEGF-A è rivolta anche a cellule non endoteliali. Infatti, recentemente, si è apprezzata anche un'azione neurotrofica. In particolare si è osservata, tramite il legame con i rispettivi recettori a livello del sistema nervoso periferico (neuropiline), una stimolazione della crescita degli assoni (Folkman, 2008).

VEGF-B: molecola espressa in diversi tessuti, in particolare nei muscoli e nel cuore. La sua azione biologica sembra rivolta principalmente alla degradazione dei componenti di matrice. Non sembra indispensabile all'angiogenesi e topi resi carenti di VEGF-B sembrano manifestare solo difetti cardiaci minori (Folkman, 2008; Papetti e Herman, 2002).

VEGF C e VEGF-D: Il VEGF-C sembra avere un ruolo predominante nella linfoangiogenesi ed è principalmente espresso durante l'embriogenesi, mentre VEGF-D è espresso anche nel cuore, polmone e muscolo scheletrico dell'adulto. Inoltre promuovono l'attività mitogenica nelle EC *in vitro* anche se in modo meno potente rispetto a quella del VEGF-A. VEGF-C e VEGF-D promuovono

l'angiogenesi *in vitro* e *in vivo* ma il loro ruolo fisiologico resta ancora sconosciuto (Folkman, 2008; Papetti e Herman, 2002).

PIGF (Placental growth factor): fattore appartenente alla famiglia VEGF, si resenta maggiormente espresso a livello placentare. Presenta un ruolo limitato nell'angiogenesi, tuttavia sembra giocare un ruolo chiave nell'angiogenesi in condizioni ischemiche (Folkman, 2008).

VEGF-E: si riferisce a un gruppo di proteine collegate al VEGF che codificano attraverso il virus *orf*, un parapoxvirus che infetta pecore, capre e alcune volte anche l'uomo ed ha un'omologia tra il 16 e il 27% con il VEGF-A. Queste proteine virali hanno conservato le funzioni del VEGF perché il loro segnale passa attraverso il VEGFR-2 e stimolano l'angiogenesi *in vitro* e *in vivo* (Folkman, 2008; Papetti e Herman, 2002).

6.4 Struttura genica e proteica del VEGF

Il gene del VEGF umano è assegnato al cromosoma 6p21.3. Ogni gene è costituito da otto esoni, separati fra loro da sette introni. Nel gene umano la regione codificante misura approssimativamente 14 Kb. Il gene del VEGF è un gene cosiddetto "interrotto". Questi geni, oltre alle normali sequenze codificanti (esoni), presentano delle sequenze aggiuntive (introni) che, essendo interne alla regione codificante, ne interrompono la sequenza. Attraverso il fenomeno dello *splicing* nucleare, dal singolo gene se ne generano diverse isoforme. Nella grande maggioranza dei casi, i geni interrotti sono trascritti in un RNA che dà origine, in seguito a *splicing*, ad un singolo tipo di mRNA. Gli RNA di alcuni geni, fra cui il gene del VEGF, seguono invece schemi di *splicing alternativo*. In tal caso un solo gene dà origine a più di una sequenza di mRNA e, conseguentemente, a

diverse sequenze proteiche con diverse funzioni biologiche (Agnoli, 2007; Lewin, 2001).

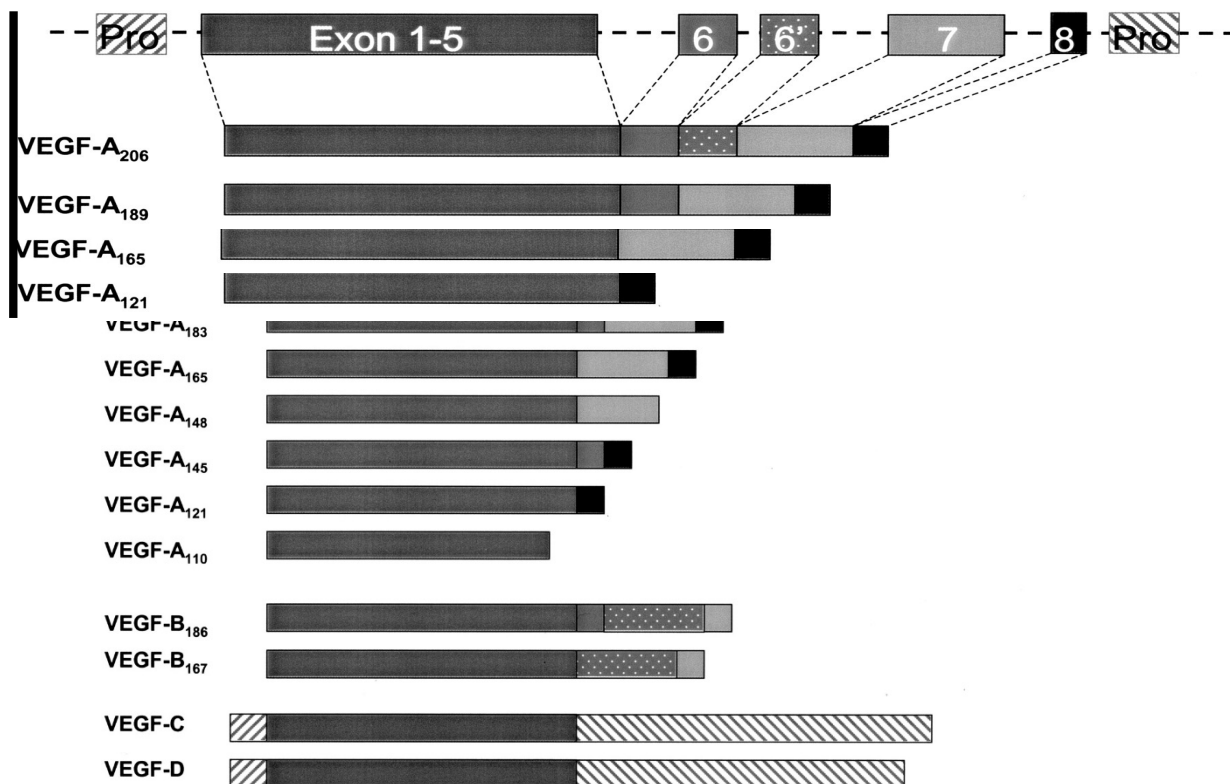


Figura 32: struttura genica del VEGFR, tratto da Ann Hoebe et al., Vascular endothelial growth factor and angiogenesis, Pharmacol Rev., 56:549, 2004.

Strutturalmente la molecola del VEGF è costituita da diversi monomeri, legati da un ponte disolfuro che si instaura tra i due residui di cisteina. Si individuano nel 3 residui acidi nel 3 esone e 3 basici sul quarto, strutture queste necessarie per l'aggancio della molecola VEGF con il recettore VEGFR-1 e VEGFR-2 rispettivamente. La particolare conformazione delle anse della molecola fa sì che queste, essendo molto flessibili, renda facile la dimerizzazione del recettore. Infatti, tre anse si sviluppano attorno ad ogni polo della molecola sull'interfaccia del dimero. La seconda ansa, sulla quale si trova il determinante per il legame con il VEGFR-1, si trova in stretto contatto

con la terza ansa del monomero opposto e su questa, a sua volta, è localizzato il determinante per il VEGFR-2. Tale particolare conformazione facilita la dimerizzazione del recettore, essenziale per la trans-fosforilazione e la trasmissione del segnale (Papetti e Herman, 2002; Robinson e Stringer, 2001).

6.5 Meccanismi di regolazione dell'espressione genica del VEGF

Ci sono ormai ampie evidenze che i tumori solidi spesso subiscono stress di tipo ipossico. Sappiamo che l'ipossia è definita come una riduzione dei valori di ossigeno sotto un livello fisiologico. Proprio durante la crescita di un tumore solido, le cellule all'interno della massa subiscono stati ipossici dovuti alla loro distanza dalla rete vascolare. Sappiamo infatti che senza una adeguata rete vascolare, una neoplasia è in grado di raggiungere solo la dimensione critica di 1-2 mm, oltre che nei tumori solidi si rinvencono stati ipossici in patologie vascolari o polmonari. Da un punto di vista fisiopatologico distinguiamo 3 tipologie di ipossia: cronica, acuta e ipossia con riperfusione.

Nella rete vascolare di una neoplasia, che sappiamo essere per definizione irregolare sia da un punto di vista anatomico che funzionale, si realizzano stati di ipossia acuta. In questi casi la risposta cellulare ai bassi livelli di ossigeno si realizza attraverso l'attivazione di specifici fattori di trascrizione, definiti come *Hipoxia-Inducible factors*, rispettivamente un HIF-1 e HIF-2. Se per HIF-2 il suo ruolo è rivolto nelle fasi di sviluppo embrionale, dove interviene in fase di assemblaggio e rimodellamento vascolare, HIF-1 riveste un ruolo fondamentale nell'angiogenesi neoplastica. Inoltre elevati livelli di HIF-1 correlano con un elevato tasso metastatico e una prognosi

infausta in medicina umana (Masoud e Li, 2015; Morfoisse et al., 2015; Metha e Dhalla; 2013).

Lo stato ipossico provoca un aumento dei livelli di VEGF tramite un meccanismo simile a quello che si osserva nel meccanismo fisiologico della produzione di eritropoietina. In entrambi i casi si verifica un aumento dell'espressione genica grazie all'attivazione dell'“**Hipoxia Response Element**” (HRE) che si comporta da *enhancer*. L'HRE è una sequenza genica di 28 basi, localizzata nella regione 5' del promotore del VEGF umano e del top, in cui il calo della tensione d'ossigeno provoca l'attivazione del fenomeno della trascrizione. Questa sequenza presenta un'elevata omologia strutturale e funzionale con la regione del gene dell'eritropoietina che si lega all'Hipoxia-Inducible Factor (HIF-1), fattore chiave anche nella regolazione ossigeno-dipendente del VEGF (Lee et al, 2017).

Inoltre diversi studi indipendenti hanno portato a dimostrare come il Fattore HIF-1 giochi un ruolo di promozione non solo a livello di VEGF, bensì interviene nell'angiogenesi anche stimolando la produzione di PDGF, nella proliferazione cellulare (MYC), nel rimodellamento della matrice extracellulare (MMP, LOX), nella migrazione ed invasione cellulare (CXCR4, SDF1) (Metha e Dhalla; 2013).

Un ruolo importante lo giocano anche gli elevati livelli di monociti circolanti che vengono attratti, grazie a fattori chemiotattici derivati dalle condizioni ipossiche della neoplasia. Essi migrano attraverso la rete vascolare neoplastica e vanno a costituire la componente TAMs (tumor associated macrophages) della neoplasia. La componente TAMs, che insieme a fibroblasti associati alla neoplasia (CAF), rete vascolare e cellule infiammatorie, costituiscono il cosiddetto

microambiente tumorale, si rende responsabile di mutazioni fenotipiche della neoplasia, promuovendo l'angiogenesi, rimodellando la matrice extracellulare e inibendo la risposta immunitaria dell'organismo (Folkman, 2008).

In assenza di fenomeni ipossici, la stabilizzazione dell'mRNA del VEGF avviene tramite inattivazione del fattore di soppressione proteica tumorale di von Hippel Lindau a cui si associa sempre un aumento dell'attivazione dell'HIF (Levy et al., 1996; Ferrara, 1999; Ferrara, 2002).

Nella sindrome di von Hippel-Lindau, infatti, in seguito all'inattivazione del gene di questa proteina, frequentemente si sviluppa un emangioblastoma a livello di retina o di cervelletto, o in alcuni casi un carcinoma delle cellule renali (clear-cell renal carcinoma) (Ferrara e Davis-Smyth, 1997).

Ricordiamo infine il ruolo di diverse citochine, in particolare IL-1 α IL-6. Queste sembrano indurre, negli stati infiammatori, l'espressione del VEGF in svariate popolazioni cellulari, per esempio nei fibroblasti sinoviali, in accordo con l'ipotesi che il VEGF abbia un ruolo fondamentale anche nella mediazione dei fenomeni flogistici (Ferrara e Davis-Smyth, 1997). Anche diversi ormoni sono risultati responsabili dell'espressione genica di VEGF. Tra questi TSH, ACTH e gonadotropine quali FSH ed LH, estrogeni e progesterone (Wong et al., 2001). Anche il fattore tissutale (TF) stimola la produzione di VEGF, in particolare nella patogenesi della formazione della fibrina e nella promozione del processo angiogenico in numerosi tumori (Shoji et al., 1998).

6.6 Le isoforme del VEGF

Il gene VEGF-A umano, attraverso un meccanismo di *splicing* alternativo, è in grado di codificare almeno 9 differenti isoforme, consistenti in 111 fino a 206 aminoacidi (Folkman, 2008).

Le 3 maggiori isoforme, Il VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ e VEGF₁₈₉, sono conosciute da diverso tempo e ben caratterizzate sia nei mammiferi che nei vertebrati. L' isoforma più abbondante è quella del VEGF₁₆₅.

Essa si trova solo per un 40 % in forma libera, mentre per la restante parte viene a trovarsi legata o alla matrice extracellulare (mediante un proteoglicano eparan –solfato detto HSPG) o alla membrana cellulare. Tra i fattori distintivi dell'isoforma 165 è la sua capacità di legarsi con l'eparina. Proprio la mancata capacità di legarsi con l'eparina distingue tale isoforma dal VEGF₁₂₁. In realtà anche altre isoforme, come VEGF₁₈₉ e 206, mostrano capacità di legame con l'eparina, tuttavia queste forme si trovano sempre sequestrate nella matrice extracellulare. Queste forme sequestrate, a causa di impedimenti sterici, non sono in grado di esercitare una attività mitogena pari all'isoforma VEGF₁₆₅, tuttavia esercitano una funzione di riserva del fattore di crescita.

Questa forma di riserva si rende poi disponibile al bisogno grazie meccanismi eparina-dipendenti (es plasmina o uPA) che portano alla formazione di frammenti di VEGF attivi, come il VEGF₁₁₀. In questo modo il VEGF, o meglio le diverse isoforme di VEGF, sono in grado di esercitare la loro capacità mitogena sulle cellule endoteliali vasali o in maniera diretta tramite la forma solubile (VEGF₁₂₁ e VEGF₁₆₅) o dopo che le isoforme VEGF₁₈₃₋₁₈₉ e 206, si sono rese disponibili post azione proteasica. Tuttavia la perdita del dominio che lega l'eparina provoca una perdita di efficacia di tali molecole, rendendo di fatto il

VEGF₁₆₅, proprio per questo motivo, l'isoforma con la maggiore efficacia biologica (Folkman, 2008).

Inoltre le diverse isoforme differiscono tra loro anche per la diversa capacità ed affinità con cui si legano a loro specifici recettori. In particolare il VEGF₁₆₅, mediante legame con il suo co-recettore NRP-1, riesce ad aumentare la sua affinità di legame con il recettore tirosin-chinasico VEGFR-2. Tale aumentata affinità di legame si riflette su un aumento della potenza del segnale tradotto (Folkman, 2008).

Recenti studi hanno dimostrato come questa eterogenicità biologica delle diverse forme di VEGF si traduca in una diversa influenza e risposta al trattamento medico. In particolare studi condotti su topi affetti da fibrosarcoma, si è osservata come l'aumentata espressione delle sole isoforme solubili di VEGF si realizzi in una aumentata espressione del fenotipo metastatico (English et al, 2017).

Anche in altre neoplasie, come il carcinoma colon-retto, si assiste ad una correlazione tra alcune isoforme di VEGF ed un'progressione nello sviluppo di metastasi (Canavese et al, 2017).

Anche in altre neoplasie si assiste ad un diverso ruolo patogenetico tra le diverse isoforme di VEGF. In particolare nel tumore mammario l'isoforma 121 sembra essere la più espressa, al contrario del carcinoma polmonare dove si è osservato una prevalenza del VEG₁₈₉ (Sabapathy P et al, 2007).

6.7 I recettori del VEGF

Il VEGF si lega ad una famiglia di recettori tirosin-chinasici (RTK), noti con il termine di VEGFRs. Questi recettori sono stati riscontrati nelle EC, ma recentemente sono stati trovati anche in altri tipi cellulari

come ad esempio nelle cellule muscolari vascolari lisce, monociti e macrofagi. Sono stati identificati tre recettori che legano i diversi fattori di crescita del VEGF: VEGFR1 (FLT-1), VEGFR2 (Flk1/KDR) e VEGFR3 (FLT4). Tutti e tre sono strutturalmente simili. Essi presentano un sito di legame vincolante a livello extracellulare, una struttura elicoidale a livello transmembranario e presenta, nella regione citoplasmatica il dominio chinasi.

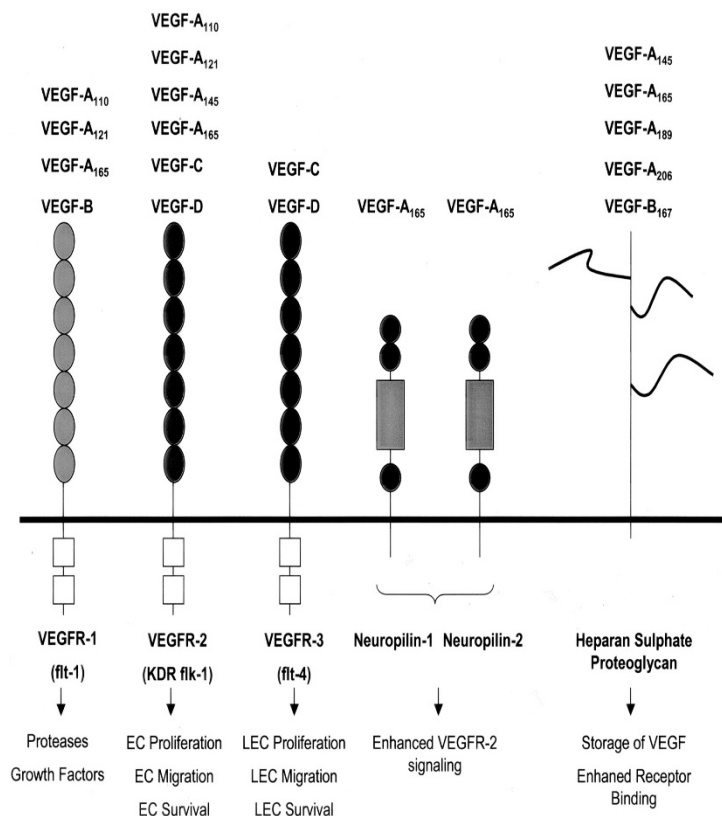


Figura 33: struttura del VEGFRs, tratto da Ann Hoebe et al., Vascular endothelial growth factor and angiogenesis, Pharmacol Rev., 56:549, 2004

La regione extracellulare è formata da sette domini simili alle immunoglobuline (IG I-VII) mentre la parte intracellulare, che presenta l'attività tirosin chinasi, è divisa in due frammenti (TK-1 e TK-2) mediante un inserto inter-chinasi.

Quando il ligando occupa il dominio extracellulare, si verifica una autofosforilizzazione nel dominio intracellulare che provoca la dimerizzazione del recettore. Si attivano quindi diverse vie di segnale (Mehta e Dhalla, 2013).

VEGFR1	FLT-1	VEGF-A, VEGF-B, PlGF	Endotelio vascolare
VEGFR2	KDR	VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E	Endotelio linfatico e vascolare
VEGFR3	FLT-4	VEGF-C VEGF-D	Endotelio linfatico

Figura 34: I recettori VEGFr e i loro ligandi, (Da Mehta e Dhalla, 2013, modificato)

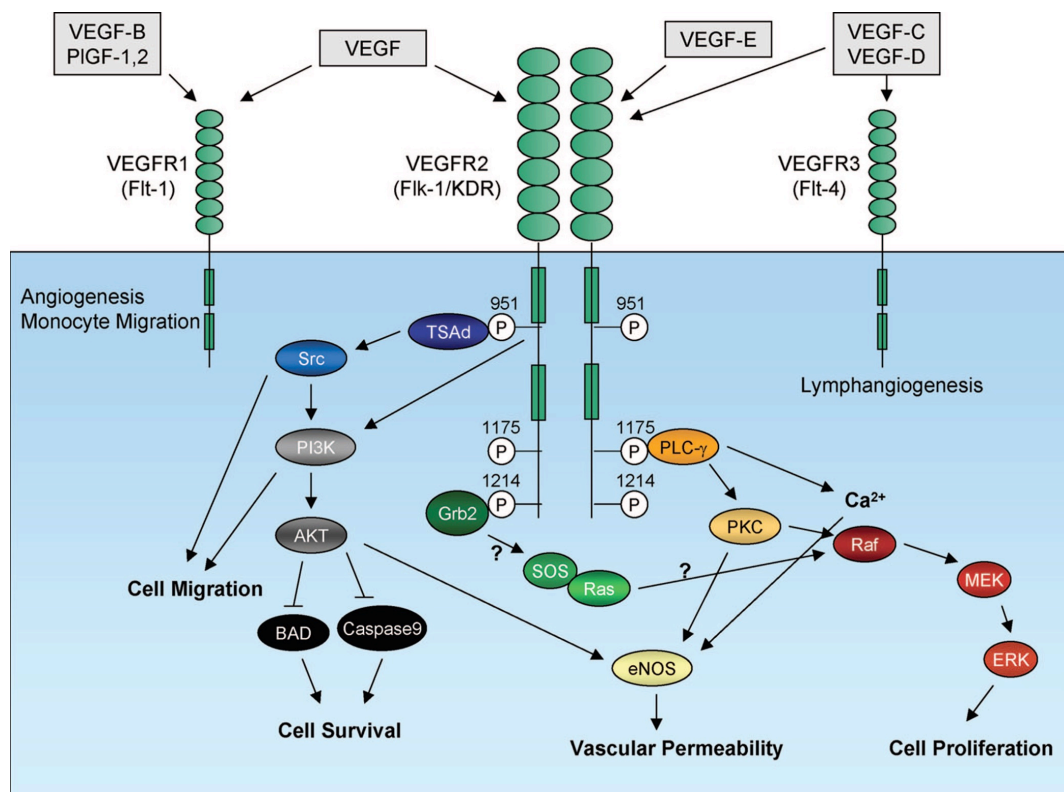


Figura 35 : vie di trasduzione del segnale mediato dal VEGF tratto da Nilsson et al., “Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) pathway” J Thorac Oncol. 2006;1: 768–770.

6.7.1 VEGFR-1

Il recettore VEGFR-1 lega il VEGF-A ed è l'unico recettore, a noi conosciuto, presente sulla superficie cellulare per VEGF-B e PlGF. Mentre il VEGF-A lega il VEGFR-1 con una maggiore affinità rispetto a VEGFR-2, la sua attività tirosin chinasi sembra più minore rispetto a quella espressa da VEGFR-2.

Proprio questo dato ha portato a ritenere che questa proteina si comporti da recettore “*decoy*” (trappola), riducendo la biodisponibilità del VEGF-A sulle cellule endoteliali prevenendo o limitando il legame di quest'ultimo al VEGFR-2 (Metha e Dhalla, 2013).

In questo modo è possibile spiegare l'azione sinergica esercitata da PlGF e VEGF-B.

Questi, occupando in maniera competitiva il recettore VEGFR-1, aumentano la quota libera di VEGF-A in grado di legarsi al VEGFR-2. L'importanza del recettore VEGFR-1 è dimostrata anche dall'osservazione che in cavie mancanti degli alleli per il VEGFR-1 non riescano ad andare oltre all'ottavo giorno di sviluppo embrionale. In questi soggetti le cellule endoteliali si sviluppano normalmente, ma non sono in grado di organizzarsi in una struttura vascolare. Infine, in organismi in cui il recettore è presente ma risulta deficitario del dominio tirosin-chinasico, non sviluppano anomalie vascolari (Kong et al, 2017; Folkman, 2008).

Infine il VEGFR-1 è in grado di esplicare anche altre attività pro angiogenitiche. In particolare è in grado di richiamare, aumentando l'espressione sulla superficie endoteliale di diversi fattori come il TF, diversi monociti che sono poi responsabili di esprimere le metalloproteinasi a livello perivasale e tramite il suo legame con il

PlGF di stimolare la produzione di cellule staminali e quindi l'ematopoiesi (Kong et al, 2017;).

6.7.2 VEGFR-2

Questo recettore è vitale per l'angiogenesi. In modelli murini un difetto di tale recettore provoca morte inesorabile a livello di sviluppo embrionale. Questo recettore si trova sia a livello di cellule endoteliali vasali che linfatiche. Esso presenta almeno 4 siti di autofosforilizzazione. La regolazione dell'espressione di questo recettore, così come quella del VEGFR-1, si realizza attraverso diversi meccanismi. L'ipossia rappresenta il principale meccanismo. Tuttavia, mentre il Flt-1 così come il VEGF presenta una sequenza di consenso per l'HIF-1 a livello del suo promotore, il Flk-1 non la possiede e la sua trascrizione è solo debolmente regolata dall'ipossia. Brogi e collaboratori tuttavia, sostengono che i tessuti ischemici sono in grado di liberare un fattore, ignoto capace di stimolare la trascrizione di VEGFR-2 (Metha e Dhalla, 2013; Folkman, 2008).

6.7.3 VEGFR-3

Questo recettore, nell'adulto, è associato solo all'endotelio linfatico. Studi eseguiti sui topi hanno dimostrato che difetti embrionali a carico del VEGF-3 sono responsabili di patologie letali, dovute ad anomalie vascolari, gravi anemie e versamenti pleurici. Il gene genera, attraverso splicing, due isoforme, entrambi con affinità per VEGF-C e VEGF-D (Metha e Dhalla, 2013).

6.7.4 Le neuropiline

L'attività della famiglia dei recettori VEGFR può essere influenzata anche attraverso l'attivazione di co-recettori. In particolare la Neuropilina (NRP), un glicoproteina transmembranaria, il cui ruolo, durante la vita embrionale, è indirizzato al controllo della crescita dell'assone. Le NRP sono delle glicoproteine conosciute anche per la loro capacità d'interazione con membri della famiglia delle collapsine/semaforine. Attualmente si conoscono due co-recettori, NRP-1 e NRP-2. Queste glicoproteine sono presenti in molti tessuti, incluse alcune cellule di natura neoplastica e cellule endoteliali.

In particolare si è osservato come alcune isoforme di VEGF-A (in particolare la 165) lega NRP-1, incrementando in maniera significativa l'affinità di legame tra VEGF_A e il recettore VEGFR-2, stimolando i segnali di angiogenesi. L'associazione dell'isoforma 165 del VEGF-A con la NRP-1 è essenziale per lo sviluppo embrionale. Un suo difetto provoca morte per scarso sviluppo dell'arco aortico ed un insufficiente sviluppo del tronco aorto-polmonare. NRP-2, tramite il legame con VEGF-C e D, si rende promotore nell'incremento dei segnali di sviluppo della rete linfatica (Simons et al, 2016; Folkman, 2008).

6.8 Il VEGF canino

Nel cane sono state identificate le stesse isoforme VEGF umane dalle quali tuttavia si differenziano per l'assenza di un residuo a livello della regione N-terminale.

Nel cane, come nella maggior parte dei mammiferi, è opportuno quindi utilizzare la seguente terminologia: **VEGF₁₆₄** e **VEGF₁₂₀**, (isoforme solubili) e **VEGF₂₀₅**, **VEGF₁₄₄** e **VEGF₁₈₈** (isoforme

insolubili, legate alla matrice extracellulare). Fra uomo e cane esiste una completa omologia della sequenza aminoacidica coinvolta nella formazione del legame recettoriale. Questa corrispondenza non solo implica che le due proteine (umana e canina) presentino le stesse proprietà di legame, ma spiega la capacità del VEGF₁₆₄ canino di attivare le cellule endoteliali umane nella stessa misura del VEGF₁₆₅.

Anche le isoforme del VEGFR-1 canino corrispondono a quelle umane e la sovra-espressione di questo recettore, unitamente a quella del VEGF, è stata evidenziata in numerose neoplasie canine (Troy et al., 2006).

CAPITOLO SETTE

IL CARCINOMA A CELLULE TRANSIZIONALI (TCC) VESCICALE NEL CANE

7 Introduzione

I tumori della vescica urinaria rappresentano solo il 2% di tutti i tumori del cane. Tra questi, il **carcinoma transazionale cellulare (TCC)**, detto anche **carcinoma uroteliale**, è il più comune, colpendo circa 20.000 cani ogni anno. Il secondo tumore maligno più frequentemente riscontrato è il carcinoma squamoso, che si pensa possa originare da aree di metaplasia di TCC che si sviluppano in aree di iperplasia delle cellule transizionali o su neoformazioni tipo papillomatoso. Altri tipi di neoplasia raramente riportati sono l'adenocarcinoma, il leiomiosarcoma e l'emangiosarcoma. Il tumore benigno diagnosticato più frequentemente è il papilloma, mentre altri tumori benigni come i fibromi e i leiomiomi sono molto più rari. (Cannon & Allstadt, 2015; Fulkerson & Knapp, 2015, Bacon & Farese, 2012; Marconato et al, 2012).

Negli ultimi 30 anni, dall'analisi dei data base dei principali ospedali veterinari degli Usa e del Canada, il TCC vescicale risulta in costante aumento (Fulkerson & Knapp, 2015).

Spesso la neoplasia viene diagnosticata già in uno stadio avanzato, ponendo diversi problemi da un punto di vista terapeutico (Fulkerson & Knapp, 2015).

È interessante notare che il cane TCC assomiglia molto al TCC di elevato grado nell'uomo, rendendolo un modello animale per la ricerca

(Cannon & Allstadt, 2015).

7.1 Fattori di rischio

Si ritiene che TCC abbia una **eziologia multifattoriale**. Tra i fattori di rischio si annoverano agenti chimici, in particolare l'esposizione ai pesticidi, l'obesità, il sesso femminile, la sterilizzazione ed il fattore razza (Budreckis et al, 2015).

Tra le sostanze chimiche, oltre alla già citata esposizione ai **pesticidi**, si segnala il possibile ruolo eziologico svolto da **antiparassitari**, in particolare di vecchia generazione, rivolti al controllo delle pulci. I prodotti più moderni, in particolare a base di fipronil, non sembrano essere implicati. In particolare il rischio aumenta con l'aumentare dello strato adiposo, probabilmente dovuto ad un effetto accumulo esercitato dallo stesso tessuto adiposo (Fulkerson e Knapp, 2015).

Tra i farmaci è ben noto il possibile ruolo svolto dalla **ciclofosfamide**, in particolare dal suo metabolita **acroleina**, nel possibile sviluppo della neoplasia. La ciclofosfamide causa una cistite emorragica sterile negli pazienti umani e nei cani e in entrambe le specie è stata segnalata la comparsa di una neoplasia uroteliale. In particolare negli esseri umani, il trattamento con ciclofosfamide aumenta il rischio neoplastico di 9 volte. È probabile che le possibili attività cancerogene sulla vescica causate dalla ciclofosfamide siano correlate all'irritazione cronica determinata dall'esposizione al metabolita dell'acroleina. Inoltre è stato segnalato che lo sviluppo del TCC potrebbe essere più probabile con le terapie orali rispetto a quelle endovenose, in quanto il metabolita responsabile, ossia l'acroleina, si forma e permane a livello vescicale (Fulkerson e Knapp, 2015; Mutsaers et al, 2003).

Non e' stata osservata una correlazione tra l'esposizione dei cani al **fumo passivo di sigaretta** e lo sviluppo di TCC, nonostante il fumo in medicina umana sia ritenuto responsabile di oltre il 50% delle neoplasie della vescica umana nei soggetti maschi e al 33% o più nei soggetti di sesso femminile. Il rischio di un cancro della vescica aumenta linearmente (2-3 volte) per le persone che fumano 10 o più sigarette al giorno per poi aumentare esponenzialmente in soggetti che fumano 40-60 sigarette al giorno (Mutsaers et al, 2003).

Il rischio associato alla razza e' ben evidente nello **Scottish Terrier**, dove è documentato un rischio di 21 volte superiore. Sono a rischio (3-6,5 volte) rispetto ai meticci anche i cani di razza nordica, **il pastore delle Shetland**, il **West Highland White Terrier**, **Keeshond**, **Samoiedo** e **Beagle** (Rippy et al, 2016; Fulkerson e Knapp, 2015).

Anche se in letteratura non sono presenti specifici studi legati alle diverse razze (fa eccezione lo Scottish Terrier) sopra indicate, diversi lavori concordano che una limitazione del peso corporeo, l'eliminazione di antiparassitari di vecchia generazione e la somministrazione di una **dieta ricca in vegetali** (ad alto contenuto di carotenoidi) possano essere valide misure profilattiche (Fulkerson & Knapp, 2015; Knapp et al, 2014; Raghavan M , 2004).

Circa il ruolo esercitato dal sesso si è osservata una maggiore incidenza a carico del sesso femminile, con un rapporto femmina/maschio di cani affetti da TCC che varia nei diversi studi tra 1,71: 1 e 1,95: 1, con ulteriore accentuazione nei soggetti sterilizzati. Un dato controverso è rappresentato dalla motivazione per cui il cane maschio sia meno esposto al rischio. Secondo alcuni Autori ciò è dovuto alla più frequente minzione, per il ruolo di marcatura del

territorio, che indurrebbe un minor tempo di contatto tra sostanze potenzialmente cancerogene e l'epitelio vescicale. (Cannon e Allstadt, 2015; Knapp et al, 2014; Marconato e Amadori, 2012; Mutsaers et al, 2003).

Il TCC del cane può essere promosso o favorito dagli ormoni sessuali considerato che sono stati individuati recettori, sia per androgeni che estrogeni; tuttavia il loro ruolo nella patogenesi della neoplasia appare ancora non chiarito (Fulkerson e Knapp, 2015)

Il carcinoma transizionale vescicale (TCC) si verifica tipicamente nei cani anziani con **età media e mediana riportata alla diagnosi che varia da 9 a 11 anni**. Tuttavia sono segnalati in letteratura anche cani piu' giovani (Knapp et al, 2014).

Il peso dei soggetti affetti variava dai 3,0 kg fino a 51 kg, con un peso medio di 15.7 kg (Mutsaers et al, 2003).

7.2 Sintomatologia clinica

I segni clinici più comuni nei cani con questa neoplasia sono rappresentati da **ematuria, stranguria e pollachiuria**. Questi segni clinici possono essere presenti da settimane a mesi prima della avvenuta diagnosi (Marvel et al, 2017; Knapp and McMillan, 2013).

Nello studio di Norris e collaboratori (1992), basato sulla sintomatologia di 115 cani affetti da carcinoma transizionale vescicale o uretrale, la disuria era presente nel 84% dei casi, una ematuria franca nel 50% dei casi ed una pollachiuria nel 37% dei casi.

La zona maggiormente interessata è il **trigono vescicale**. Si possono osservare lesioni papillari, masse o ispessimenti diffusi o localizzati della parete vescicale. **Nel 56 % dei casi si assiste ad un**

coinvolgimento uretrale, mentre la prostata è interessata nel 29 % dei casi (Knapp et al, 2014).

Meno frequentemente si posso osservare tenesmo e zoppie, dovute queste ultime a metastasi ossee o all'osteopatia ipertrofica (Fulkerson e Knapp, 2015; Mutsaers et al, 2003).

Spesso la terapia antibiotica porta ad una veloce seppur temporanea risoluzione dei segni clinici, di fatto ritardando la diagnosi. I cani, in particolare nei soggetti anziani, in cui si riscontrino infezioni urinarie ricorrenti o non rispondenti ad una adeguata terapia antibiotica, devono essere rivalutati per la ricerca di eventuali calcoli o neoplasie (Fulkerson e Knapp, 2015; Cannon e Allstadt, 2015).

La persistenza di una infezione batterica secondaria, o il susseguirsi di recidive possono determinare insufficienza renale, pielonefriti, setticemie, prostatiti e discospondiliti (Budreckis et al, 2015).

L'esame fisico del paziente è di grande importanza, perché con una **ispezione rettale** dei soggetti si può rilevare un ispessimento della regione uretrale uretrale e del trigono vescicale. Inoltre tale manualità potrebbe permettere di identificare una linfadenopatia iliaca. Anche se non di frequente riscontro, il TCC può metastatizzare alla cute, causando lesioni eritematose, ulcerate o proliferative. D'altra parte un esame fisico nella norma non permette di escludere il TCC (Fulkerson e Knapp, 2015; Reed et al, 2013; Withrow ,Vail and Page, 2012).

7.3 Diagnosi

La presenza di cellule epiteliali anomale nel sedimento urinario o un ispessimento della parete o ancora una massa a carico della vescica devono porre un forte sospetto di un possibile TCC. Tuttavia queste

condizioni si rinvenivano anche in altre patologie non neoplastiche (cistiti croniche, polipoidi, granulomi, calcoli) che presentano percorsi diagnostici e terapeutici totalmente differenti e di conseguenza un corretto approccio diagnostico è di importanza fondamentale (Fulkerson e Knapp, 2015; Withrow, Vail and Page, 2012).

Il punto chiave nella diagnosi del TCC rimane la conferma del sospetto diagnostico tramite esame istologico (Withrow, Vail and Page, 2012)

Sebbene le cellule neoplastiche possano riscontrarsi nell'urina del 30% dei cani affetti da TCC, gravi errori diagnostici possono essere rappresentati dalle cellule epiteliali flogistiche, erroneamente scambiate per neoplastiche (Withrow, Vail and Page, 2012).

Ricordiamo che in questa neoplasia le urine devono essere raccolte per minzione spontanea o tramite cateterismo, essendo alti i rischi di disseminazione metastatica peritoneale lungo il tragitto dell'ago in corso di cistocentesi (Nyland et al, 2002; Vignoli et al, 2007)

A fini diagnostici è stato proposto la ricerca di uno specifico test antigenico per la ricerca del TCC nelle urine. Tuttavia l'elevato numero di falsi positivi ha mitigato le speranze iniziali. Tuttavia una sua negatività, nell'utilizzo come test di screening, porta ad una bassa probabilità di avere un TCC (Henry et al, 2003; Fulkerson & Knapp, 2015).

I campioni biotici da sottoporre ad esame istologico ed eventuale immunoistochimica, possono essere raccolti tramite cistotomia, cateterismo traumatico e **cistoscopia**. Questa ultima metodica consente, oltre la già menzionata possibilità di raccolta di campioni biotici di buona qualità, la diretta osservazione dell'uretra e della vescica. Tale procedura, per motivi anatomici, risulta di facile

esecuzione nella femmina, mentre nel maschio, il fattore limitante potrebbe essere dato dalla taglia del cane che dalle dimensioni dell'endoscopio flessibile disponibile (Fulkerson e Knapp, 2015; Cannon e Allstadt, 2015).

Nello studio di Childress, basato su 92 cani sottoposti a procedura di cistoscopia, nel 96% dei soggetti femmina si riusciva a raccogliere campioni bioptici in grado di confermare la diagnosi di TCC. Tale percentuale scendeva nei soggetti maschi al 65%, in seguito alle difficoltà di passaggio del cistoscopio (Childress et al, 2011).

Nei casi in cui la diagnosi non possa essere raggiunta solo tramite un'indagine istologica, può essere utilizzato UPIII (uropilakin III) come marker immunoistochimico in grado di differenziare lesioni di TCC da carcinomi scarsamente differenziati. Infatti tale marker è espresso in oltre il 90 % dei TCC. Nonostante l'elevata specificità, si ricorda che tale marker può venire espresso anche nel carcinoma prostatico del cane (Fulkerson e Knapp, 2015; Sledge et al, 2014, Bracha et al, 2014).

7.4 Valutazione del soggetto e stadiazione della neoplasia

Una volta confermato il sospetto diagnostico si deve procedere ad una valutazione clinica generale del soggetto ed ad una **accurata stadiazione della** patologia in esame, al fine di poter offrire dei dati completi ai proprietari, sia in riferimento alle opzioni terapeutiche che alla prognosi.

Nei cani con diagnosi di TCC confermata si deve eseguire un esame emato-biochimico completo, analisi delle urine con o senza urocoltura, radiografie del torace, ecografia addominale (al fine di

svelare metastasi epatiche o linfonodali) ed eseguire un imaging del tratto urinario . Per questo ultimo possono essere utilizzate diverse metodiche di studio, come la cistografia o la tomografia computerizzata. Essendo questa ultima tecnica in grado di fornire informazioni sia della dimensione e localizzazione della massa neoplastica, dell'interessamento linfonodale e/o di altri organi parenchimatosi, nonché di identificare eventuali, se pur rare, metastasi ossee, risulta la tecnica di imaging di prima scelta per le indagini di stadiazione (Fulkerson e Knapp, 2015; Cannon e Allstadt, 2015; Withrow, Vail and Page, 2012).

Una volta in possesso di questi dati, la neoplasia viene inquadrata nel clinical staging system TNM della WHO che riportiamo nella tabella sottostante.

Table 1. Clinical Stage (TNM) of canine TCC.⁴¹

T: Primary tumor
Tis Carcinoma in situ
T0 No evidence of primary tumor
T1 Superficial papillary tumor
T2 Tumor invading the bladder wall, with induration
T3 Tumor invading neighboring organs (prostate, uterus, vagina, and pelvic canal)
N: Regional lymph node (internal and external iliac lymph node)
N0 No regional lymph node involved
N1 Regional lymph node involved
N2 Regional lymph node and juxtaregional lymph node involved
M: Distant metastases
M0 No evidence of metastasis
M1 Distant metastasis present

TNM, tumor/node/metastasis classification scheme; TCC, transitional cell carcinoma.

Figura 36: *TNM carcinoma transizionale vescicale del cane* (da Owen L.N., TNM Classification of Tumors in Domestic Animals. WHO, Geneve, 1980).

Se la TC (tomografia assiale computerizzata) può essere indicata come un esame ottimale al fine di ottenere le informazioni necessarie per inquadrare lo stadio di malattia, l'ecografia risulta essere il miglior metodo di imaging per controllare sia le risposte terapeutiche, compresi i cambiamenti della massa neoplastica. In questi casi è di fondamentale importanza standardizzare la metodica, utilizzando la stessa strumentazione, il medesimo operatore, mantenendo il cane sempre nello stesso decubito (Fulkerson e Knapp, 2015).

Ricordiamo che solo 1 cane su 6, al momento della diagnosi, si presenta metastatico (linfonodi regionali e/o polmoni). Spesso i soggetti vengono sottoposti ad eutanasia per ostruzione delle vie urinarie dato dallo sviluppo della neoplasia primaria piuttosto che per le metastasi (Cannon e Allstadt, 2015)

7.5 Trattamento

Fortunatamente sono stati compiuti diversi progressi nel trattamento di questa patologia e, ad oggi, tale neoplasia è considerata “*very treatable*” (Fulkerson e Knapp, 2015).

7.5.1 Chirurgia e radiologia interventistica

Le indicazioni chirurgiche possono sostanzialmente essere 3:

1. Ottenere campioni biotici
2. Tentare una rimozione completa qualora la massa non coinvolga il trigone
3. Effettuare una chirurgia parziale, ossia un debulking, al fine di ripristinare il flusso urinario

La resezione completa di un TCC vescicale appare spesso difficoltosa, in particolare quando la neoplasia coinvolge il trigono vescicale. Inoltre, molti cani, sviluppano una patologia multifocale (Marvel et al, 2017; Konietschke et al, 2012).

Nell'ambito delle scelte terapeutiche va considerato che questa neoplasia può estendersi ai tessuti contigui, in particolare a carico della parete addominale ed è compito dello specialista di mettere in atto tutte le misure necessarie al fine di ridurre questa possibilità (Marvel et al, 2017; Fulkerson e Knapp, 2015). Infatti nello studio di Higuchi e collaboratori è stato osservato il fenomeno della disseminazione metastatica di TCC a carico della parete addominale in 24 casi. Tale complicazione si era verificata in corso di procedure biotiche per la raccolta dei campioni, chirurgie parziali, inserimento di cateteri urinari attraverso la parete addominale. In tutti questi casi, dove si è verificato il fenomeno metastatico, la prognosi si è rivelata infausta (Higuchi et al, 2013).

Ancora, analogamente a quanto succede in medicina umana, in seguito ad una resezione chirurgica di TCC si assiste allo sviluppo di diverse lesioni neoplastiche multifocali all'interno della vescica. (Marvel et al, 2017;)

In letteratura la possibile spiegazione di tale fenomeno è data dalla trasformazione del tessuto vescicale indotta dalla neoplasia, che renderebbe l'organo un ottimo terreno per l'attecchimento delle cellule neoplastiche portate in "sospensione" dalla procedura chirurgica (Azemar et al, 2011)

Come per altre neoplasie, è possibile associare farmaci chemioterapici dopo una terapia chirurgica, anche se non si è giunti ancora ad una chiara evidenza relativamente a tali procedure (Fulkerson e Knapp,

2015), pur considerando che l'associazione chirurgia e chemioterapia, in una pubblicazione, ha portato ad un significativo incremento della sopravvivenza rispetto a pazienti che sono stati trattati solo con chemioterapia (475 giorni vs 31 giorni) (Molnar e Vajdovich, 2012).

Nonostante diverse tecniche chirurgiche siano state sviluppate nel tentativo di operare la neoplasia anche in caso di coinvolgimento del trigono e/o si è tentato di utilizzare diversi tessuti in sostituzione del tessuto vescicale neoplastico, queste tecniche non hanno trovato larga applicazione sia per la difficoltà tecnica che per le complicazioni ed i costi di intervento (Fulkerson e Knapp, 2015; Wongsetthachai et al, 2011; Zhang et al, 2006).

Se il ruolo della chirurgia curativa è in questo tipo di lesioni estremamente limitato, qualsiasi procedura atta a ripristinare e/o mantenere il flusso urinario gioca un ruolo chiave nella sopravvivenza e prognosi del paziente. A tale scopo risulta interessante l'applicazione, con diverse tecniche, di **stent uretrali**. Questi, posizionati per via chirurgica o sotto guida fluoroscopica, permettono di ripristinare il flusso urinario e, essendo interni, non possono essere "aggrediti" dalla bocca del cane (come un tubo per cistotomia) e non necessitano di pulizia e manutenzioni quotidiane da parte del proprietario.

In uno studio basato su 19 cani affetti da TCC confermato istologicamente, il posizionamento di uno stent è risultato essere efficace in 17 casi. In uno non è stato anatomicamente possibile l'inserimento, l'altro è stato sottoposto ad eutanasia. La procedura non è stata scevra di complicazioni, tra le quali si è osservato incontinenza urinaria (7/17), ri-ostruzione urinaria (3/17) e migrazione dello stent dopo suo posizionamento (McMillan et al, 2012)

In un altro studio, basato su di un numero più consistente di casi (42), gli Autori concordano come l'impianto di stent uretrali in caso di carcinoma ostruttivo uretrale possa essere un efficace trattamento palliativo. Tuttavia, come segnalato nello studio di McMillan, un 26 % dei cani trattati ha sviluppato una severa incontinenza. (Blackburn et al, 2013)

In particolare l'incontinenza si assiste nel sesso femminile e, così come nei soggetti maschi, pone la potenziale maggiore esposizione dei proprietari ai residui dei farmaci chemioterapici utilizzati per il trattamento della neoplasia (Cannon e Allstadt, 2015)

Un'altra tecnica interventistica, mutuata dalla medicina umana è la resezione transuretrale (TURB- Trans Urethral Resection of the Bladder). L'intervento consiste nell'asportazione di una o più neoformazioni endovesicali tramite uno strumento endoscopico (resettore) che viene inserito in vescica attraverso l'uretra. Tale strumento è dotato di una piccola ansa metallica attraverso la quale viene condotta una corrente elettrica che può essere utilizzata a diverse intensità per resecare o coagulare. Tale procedura ha come fattore limitante la superficialità della neoplasia (Tis, T1), che si realizza nel 80 % dei carcinomi vescicali dell'uomo. Tuttavia nel cane assistiamo più frequentemente a neoplasie infiltranti al momento della diagnosi, limitando di fatto l'utilizzo di questa tecnica (Fulkerson e Knapp, 2015).

In un lavoro di Liptak e collaboratori, basato su 6 cani, la tecnica è risultata utile nel trattamento palliativo del carcinoma prostatico, mentre nelle femmine affette da TCC uretrale la tecnica non offre alcun vantaggio in più rispetto all'applicazione di un catetere da cistotomia (Liptak et al, 2004).

Recentemente è stato descritto l'utilizzo, a scopo palliativo, del laser a diodi, inserito attraverso il canale di servizio dei cistoscopi. La procedura era realizzata sotto visione ecografica, aumentando in questo modo la sicurezza della procedura. In questi casi veniva effettuato un intervento di debulking. La sopravvivenza media, basata su 38 cani trattati, fu di 380 giorni. Tuttavia, l'associazione di altri trattamenti, non permette di chiarire esattamente il solo ruolo del laser. Potenziale complicazione è la perforazione della vescica e/o dell'uretra (Cerf e Lindquist, 2012).

7.5.2 Radioterapia

Fino a poco tempo fa l'utilizzo della radioterapia nel trattamento dei TCC vescicali, o delle neoplasie vesicali in generale, è risultato piuttosto limitato. Questo è dovuto alle importanti complicazioni (cistiti, incontinenza urinaria, coliti) che rendevano di fatto poco praticabile tale tecnica terapeutica (Fulkerson e Knapp, 2015; Cannon e Allstadt, 2015; Withrow, Vail and Page, 2012).

Il motivo della difficoltà tecnica di irradiare la vescica è che l'organo non si trova in una posizione fissa all'interno dell'addome, potendo quindi fluttuare. Inoltre il materiale fecale può comprimere l'organo, cambiandone forma e posizione (Fulkerson e Knapp, 2015).

Inoltre, in uno studio basato su 10 cani irradiati e sottoposti a terapia con mitoxantrone e piroxicam, gli effetti collaterali sono risultati accettabili, tuttavia i tempi di sopravvivenza non sono risultati maggiori rispetto alla sola somministrazione della terapia medica (Poirier et al, 2004)

Recentemente, sulla base dei frequenti trattamenti radioterapeutici che

si eseguono per questa neoplasia in medicina umana, sono comparsi dei lavori in medicina veterinaria che sembrano offrire interessanti risultati (Cannon e Allstadt, 2015).

Choy e Fidel, in un lavoro del 2016, hanno trattato 13 cani con TCC vescicale, di cui 6 trattati in prima battuta e 7 cani dopo che la precedente chemioterapia adottata aveva smesso di dare risultati, con un protocollo basato su 10 sedute giornaliere di 2.7 Gy. Gli effetti collaterali acuti si sono verificati nel 31 % dei casi, ma sono risultati di grado 1 e 2. Durante lo studio sono stati somministrati farmaci anti cox-2 (Choy e Fidel, 2016)

7.5.3 Chemioterapia

La somministrazione di chemioterapici per via sistemica rappresenta lo standard di cura per il trattamento di questa neoplasia (Choy e Fidel, 2016; Cannon e Allstadt, 2015; Withrow, Vail and Page, 2012).

La terapia si basa su farmaci inibitori della ciclossigenasi, in particolare della ciclossigenasi 2 (COX-2), usati da soli o in combinazione con altre molecole. Tra queste categorie di farmaci il Piroxicam, utilizzato al dosaggio di 0,3 mg /kg/SID risulta essere il farmaco più utilizzato in prima linea, tuttavia recenti studi hanno valutato l'efficacia di altre molecole anti COX-2, come il deracoxib (Deramaxx ®) e il firocoxib (Previcox®) (Cannon e Allstadt, 2015; Fulkerson & Knapp, 2015; McMillan et al, 2011).

In uno studio, basato su 34 cani, la sola somministrazione di Piroxicam non ha portato a tempi medi di sopravvivenza superiori ai 6 mesi. (Knapp et al, 1994). Diversamente, in un altro studio basato su 26 cani, la sola somministrazione di Deracoxib (3 mg/kg SID) ha

portato ad un MST si circa 300 giorni. Tuttavia, in 10 casi, al Deracoxib e' stato aggiunto un altro chemioterapico in quanto vi era malattia progressiva (Cannon e Allstadt, 2015; McMillan et al, 2011)

Gli effetti collaterali di questi farmaci, in particolare per il piroxicam, sono a carico del rene (possibile nefrotossicità) e dell'apparato gastroenterico. Se per l'apparato renale è auspicabile un controllo mensile della funzionalità renale, gli effetti collaterali gastrointestinali (vomito, ulcere gastriche) possono essere mitigati dalla somministrazione di misoprostolo, ricordando che tale farmaco è abortigeno e quindi non deve essere manipolato da donne in gravidanza. Inoltre tale farmaco presenta un indice terapeutico molto ridotto, perché' in caso di sovradosaggio induce disturbi gastroenterici. Altri farmaci utilizzabili per la prevenzione di questi effetti collaterali, come l'omeprazolo e la famotidina, non sono supportati da alcun studio specifico in medicina veterinaria, ma vengono utilizzati per l'evidenza dei benefici che si riscontrano in medicina umana. (Cannon e Allstadt, 2015).

Altri agenti citotossici utilizzati nel trattamento di questa neoplasia sono il mitoxantrone, i sali del platino (cisplatino e carboplatino), la doxorubicina, la vinblastina, la vinorelbina e la gemcitabina. (Cannon e Allstadt, 2015; Fulkerson e Knapp, 2015)

Si segnala anche l'utilizzo, in modalità metronomica, del clorambucile, al dosaggio di 4 mg/m^2 (Schrempp et al, 2013)

Nella tabella sottostante sono indicate le principali molecole utilizzate nel trattamento del carcinoma transizionale del cane, in particolare riportando il numero di cani valutati nello studio e la sopravvivenza media espressa in giorni.

Molecola/e utilizzata/e	Numero di cani arruolati nello studio	Sopravvivenza media (giorni) e bibliografia
Piroxicam	76	244 (Knapp et al, 2014)
Deracoxib	24	323(McMillan et al, 2011)
Mitoxantrone /Piroxicam	48	291(Henry et al, 2003)
Vinblastina	28	147 (Arnold et al , 2011)
Cisplatino (50-60 mg/m2)	28	105-130 (Moore et al., 1990; Chun et al., 1996, 1997; Knapp et al., 2000, 2013; Boria et al., 2005; Greene et al., 2007)
Cisplatino/piroxicam	12	329 (Mohammed et al., 2003)
Carboplatino	12	132 (Chun et al., 1997)

Carboplatino/piroxicam	29	161 (Boria et al., 2005)
Gemcitabina/piroxicam	38	230 (Marconato et al., 2011)
Doxorubicina/piroxicam	23	168 (Robat et al., 2013)
Clorambucile mod metronomica	30	221 (Schrempp et al., 2013)
Firocoxib	15	152 (Knapp et al., 2013)
Cisplatino/firocoxib	14	179 (Knapp et al., 2013)
Vinorelbina	14	187 (Kaye et al., 2013)
Toceranib e vinblastina	10	(Rippy et al, 2016)
Mitoxantrone e piroxicam	25	155 (Hazzah et al., 2013)

Figura 37: Riassunto dei principali studi chemioterapici Fonte: da Fulkerson e Knapp, 2015, modificata

L'associazione tra mitoxantrone, carboplatino o vinblastina, associato ad una molecola ad azione anti COX-2, rappresenta il trattamento di prima scelta. Si segnala che l'utilizzo del cisplatino, in associazione con il piroxicam, pur determinando tassi di remissione, parziale o completa, molto alti (circa il 70 % contro al 35-38 % delle molecole prima menzionate), non è raccomandabile per l'elevata nefrotossicità che l'azione sinergica delle molecole esercita (Cannon e Allstadt, 2015). L'utilizzo del carboplatino risulta una buona alternativa al riguardo, anche se i casi pubblicati sono inferiori (Boria et al, 2005).

Recentemente, Rippy e collaboratori hanno voluto valutare l'efficacia dell'utilizzo combinato di vinblastina e toceranib nel trattamento del TCC. Lo studio, che si basava su 10 cani, non ha dimostrato un maggior successo utilizzando la combinazione dei due farmaci rispetto al solo utilizzo della vinblastina (Rippy et al, 2016).

7.5.3.1 Terapia intrarteriosa o intravenosa

Una interessante possibilità terapeutica, già sperimentata in umana, prevede la somministrazione di carboplatino per via arteriosa. In uno studio retrospettivo basato su 15 cani, la somministrazione intrarteriosa di carboplatino si è dimostrata essere superiore nella capacità di diminuire le dimensioni della neoplasia vescicale rispetto al gruppo di controllo che riceveva la stessa molecola per via endovenosa. Inoltre gli effetti collaterali (anemia, letargia ed anoressia) sono stati significativamente minori nel gruppo intraarterioso rispetto a quello intravenoso (Culp et al, 2015).

7.5.3.2 Terapia intra-vescicale

Utilizzata in sinergia con la chemioterapia sistemica, tale metodica, in accordo con quanto si verifica in medicina umana, è riservata ai soli casi di neoplasia superficiale. Essendo tali casi rari nel cane, la metodica trova scarse applicazioni (Withrow, Vail and Page, 2012).

In letteratura (trial fase I) si segnala l'utilizzo di mitomycina C. Ha prodotto, in uno studio basato su 13 cani, malattia stabile in circa il 50% dei casi. Tuttavia si devono segnalare effetti collaterali importanti (mielosoppressione ed effetti gastrointestinali) in 2 cani, dovuti all'assorbimento sistemico del farmaco iniettato in vescica. (Abbo et al, 2010)

E' stato anche valutato, in uno studio retrospettivo, l'utilizzo di IL-2 intralesionale nel TCC vescicale e uretrale a scopo palliativo. Lo studio era basato su 25 cani con diagnosi istologica/citologica. Oltre al trattamento con IL-2 iniettata nel 50 % per via transaddominale sotto guida ecografica e il restante 50% iniettata post chirurgia citoreducente, venivano somministrati anti-COX-2. Il farmaco si dimostrava sicuro e scevro da importanti effetti collaterali. 17 cani su 25 mostravano un netto miglioramento clinico ed una risposta completa si verificava in 4 cani (Konietschke et al, 2012).

7.6 Ruolo del BRAF

Le mutazioni del gene BRAF possono aprire importanti risvolti sia diagnostici che terapeutici in diverse tipologie neoplastiche, sia dell'uomo che del cane.

Le cellule dei mammiferi contengono 3 distinti proto-oncogeni *ras* (*H-ras*, *K-ras*, *N-ras*) che codificano per le 4 proteine Ras (p21), H-

ras, N-Ras, K-ras, a sua volta distinta in 4KA e 4KB, strettamente correlate tra loro. Agli estremi C-terminali di queste molecole si trovano, tramite legame covalente, delle code lipidiche (costituite da diversi gruppi palmitilici, farnesilici o combinazioni) in grado di permetterne l'ancoraggio delle sopramenzionate proteine alla superficie interna della membrana cellulare. Queste isoforme mostrano una omologia del 98-100% della sequenza aminoacidica tra forme umane e canine. Questo ha portato allo sviluppo di diversi studi sul ruolo delle mutazioni Ras in oncologia del cane al fine di utilizzarli come modelli di comparazione per la patologia umana (Jinesh et al, 2018; Mochizuki e Breen, 2016).

Queste proteine divennero un punto chiave nella ricerca in campo oncologico in seguito all'osservazione che, i retrovirus oncogeni contenevano gli oncogeni H-*ras* e K-*ras* (rispettivamente i virus del sarcoma di Harvey e Kirsten) (Jinesh et al, 2018).

La proteina Ras funziona come un interruttore. Si accende e si spegne a seconda che leghi il nucleotide guanositico GTP(on) o GDP(off).

Il meccanismo che sta alla base all'attivazione della proteina Ras da una forma inattiva ad una forma attiva, è rappresentata da stimoli mitogeni che arrivano da recettori tirosinchinasici. Questi sono infatti in grado di attivare una proteina intermedia (GEF-*guanine –nucleotide exchange factor*) che porta Ras a liberarsi di GDP per legarsi a GTP. Una volta attivata la proteina questa fa da ponte, collegando e prolungando segnali che da monte sono trasmessi a valle. Una volta fatto ciò la proteina ritorna ad una forma inattiva mediante un'idrolisi favorita dalla proteina GAP. (Figura 38)

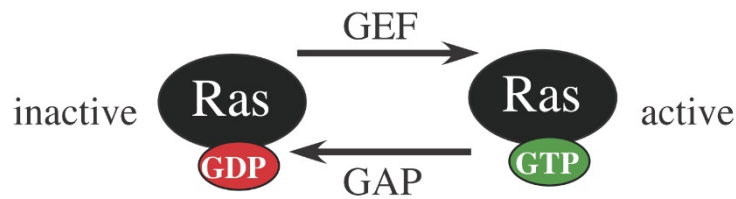


Figura 38: meccanismo di attivazione della proteina Ras

Fu quindi di fondamentale importanza la scoperta che la proteina Ras, codificata dal virus del sarcoma di Harvey, era in grado di mantenersi attivata in modo perenne. Infatti l'assenza di attività GTPasica impediva di fatto alla proteina di spegnersi. Proprio l'osservazione dei geni *ras* misero in evidenza la quasi costante presenza di mutazioni nei codoni 12,13 e 61. Il motivo di tale localizzazione risiede sia nella loro particolare sensibilità ad agenti cancerogeni, sia al fatto che nei residui aminoacidi presenti in questi codoni risiede l'attività GTPasica (Stenman et al, 2016).

Durante lo studio della modalità di trasmissione del segnale mediato dai recettori tirosinchinasici si nota la presenza di una doppia e distinta capacità di trasduzione:

- a- **legame con fattori solubili** (fattori di crescita). Utilizzano questa via recettori come EGFR e PDGFR
- b- **legame attraverso l'ancoraggio** a molecole (non solubili) presenti sulla ECM. Tipicamente funzionano in questo modo le integrine

In questo modo la cellula permette, attraverso questo doppio controllo, il controllo della reale ed effettiva necessità di iniziare un processo di crescita e divisione (Lau et al, 2014)

Questi due pre-requisiti fondamentali sono elusi dalla proteina ras – modificata. Questa proteina è difatto in grado di mimare questi due

meccanismi di controllo (Fuentes –Calvo et al, 2012).

La svolta nella comprensione del ruolo di Ras come *interruttore molecolare* avvenne durante gli studi sulla genetica dello sviluppo degli occhi dell'insetto (ordine dei Diptera) *Drosophila Melanogaster*. In particolare si pose l'attenzione su di una serie di geni che erano i responsabili della produzione di sostanze ormonali in grado di regolare la produzione degli ommatidi, elementi fotosensibili costituenti gli occhi della maggior parte degli insetti (vedi figura n. 40).

Ciascun ommatidio è formato da 7 cellule: 6 periferiche ed una centrale



Figura 39: ciascun occhio è formato da migliaia di ommatidi, formanti una sorta di mosaico (tratto da www.focus.it).

Proprio la scoperta della mutazione da parte di un gene, denominato *sevenless*, porta all'incapacità di produrre la cellula centrale dell'ommatide. La proteina non prodotta, in seguito a mutazione del *sevenless*, è una proteina analoga a EGFR.

Altre analisi mutazionali, a carico di geni simili, in particolare del gene *son of sevenless (SOS)*, portarono al chiarimento che le proteine prodotte da tali geni erano proteine GEF, in grado di attivare Ras.

(Geissler et al, 2013; Pierre et al, 2011)

Durante gli studi furono individuate proteine intermedie, fondamentali nella cascata del segnale di trasduzione. In particolare 2 molecole si rivelarono *adattatrici*, ossia in grado di fare da ponte tra recettori di fattori di crescita e la proteina Sos. (Bolanos-Garcia, 2005; Brodie et al; 2005)

1. 1-proteina Shc
2. 2-Grb-2

Si arrivò quindi a capire che Ras si attiva attraverso una sequenza lineare di segnali

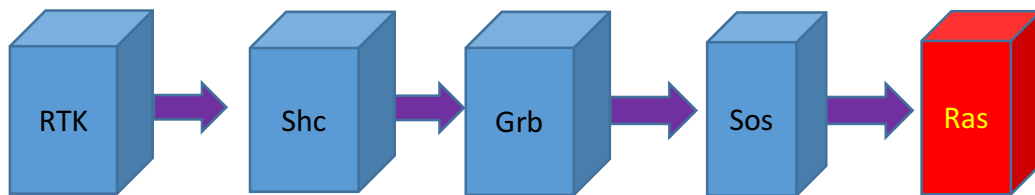


Figura 40: sequenza lineare del segnale

Tuttavia si conosceva il percorso ma non il modo in cui il segnale si trasmetteva. Ipotesi erano rappresentate dalla capacità di RTK di, tramite fosforilazione, di far assumere assetto tridimensionale a proteine citoplasmatiche e di fatto attivandole, oppure, altra ipotesi era la ricollocazione fisica delle proteine in seguito sempre a fosforilazione dell'attività del recettore tirosinchinasico. Quest'ultima ipotesi si rivelò essere vera, una volta analizzata la struttura della proteina Src, prodotta dal gene v-Src del virus del sarcoma di Rous (Roskoski, 2014)

La capacità di tale proteina di trasformare una cellula normale in neoplastica risultò essere chiara dopo l'analisi cristallografica della proteina. La Src si rivelò essere una proteina tirosinchinasica con 3 domini distinti, presenti anche in altre chinasi

SH1 (dominio catalitico)

SH2 (dominio regolatore)

SH3(dominio regolatore)

Il dominio catalitico (SH1) è comune in tutti i recettori tirosinchinasici. SH2 agisce come un recettore, il cui ligando è un oligopeptide dotato di un residuo tirosinico fosforilato. Ne esistono quindi diversi tipi di SH2. Proprio lo studio di questo legame ha dimostrato come i recettori tirosinchinasici emettono i segnali.

Il recettore, una volta legato il suo ligando, si attiva portando ad esporre una serie di residui fosfotirosinici lungo la sua coda citoplasmatica. La carta di identità del recettore è dato dalla sequenza di aminoacidi che si pongono accanto al residuo fosfotirosinico del lato C-terminale. Sono queste fosfotirosine che divengono poi sedi di attivazione per altre proteine contenenti il dominio SH2. Queste proteine sono liberamente disperse nel citosol. Una volta avvenuto il contatto (coda recettore con dominio SH2) inizia la fosforilazione, dettata questa dall'attività tirosinchinasica del recettore (Lopez et al, 2010)

In questo modo si attivano le cosiddette “*cascade di segnale*”. Queste ultime sono spesso dotate di meccanismi di controllo a “*feedback negativo*”, in grado di spegnere l'attività del recettore stesso una volta venuto meno il suo compito

Diversi studi hanno identificato, a proteina Ras attivata, 3 cascate di segnale

1-percorso Ras-Raf-MAP chinasi (**MAPK pathway**)

2-percorso PI3 chinasi (**PI3K pathway**)

3- percorso Ral (**RAL pathway**)

In questa sede, volendo discutere del ruolo di Braf nella cancerogenesi del carcinoma vescicale, tratteremo in dettaglio la MAPK pathway.

MAPK pathway si ha una volta che Ras si attiva, attraendo a se Raf che si trova libera nel citosol. Una volta che Raf viene fosforilata essa va ad attivare una seconda chinasi, MEK. A sua volta MEK è in grado di fosforilare altre 2 chinasi, Erk1 e Erk2, a loro volta in grado di agire su diversi substrati. Mutazioni lungo questa cascata di segnale possono essere responsabili dello sviluppo di diverse forme neoplastiche, come il cancro del colon retto e il tumore ovarico.

La via di segnale mitogeno non è tuttavia esaurita solo attraverso l'attivazione dell chinasi Erk 1 e 2, bensì abbiamo anche l'attivazione di altre chinasi, come le *Jun Amino terminal chinasi* (JNK 1-2-3) e P308-MAPK e ERK-5 (Yu Sun et al, 2015; Burotto et al, 2014; Johansson e Brage, 2014; Peyssonau et Eychene, 2001).

Proprio un recente lavoro di Mochizuki e Breen ha preso spunto dalla alta prevalenza di mutazioni Ras in medicina umana e, vista l'alta omologia delle isosoforme nelle due specie, ha analizzato la frequenza di queste mutazioni in diverse neoplasie del cane. I risultati hanno portato a rilevare tale mutazione in poche neoplasie del cane (Mochizuki e Breen, 2016; Zorzan et al, 2015; Edwards et al, 1993).

Questi dati pongono l'attenzione su possibile diverso ruolo della MAPK pathway nella cancerogenesi dell'uomo rispetto al cane.

Tuttavia la mutazione del Braf rappresenta un'altra possibile via con cui la MAPK pathway possa essere attivata (Mochizuki e Breen; 2016).

Circa le proteine RAF esse sono proteine serin-treonin chinasi distinte in 3 isoforme ARAF, BRAF e CRAF, le quali svolgono ruoli cruciali lungo la via del segnale RAS-RAF-MAPK. Se ARAF e CRAF giocano importanti ruoli in ambito fisiologico, le mutazioni di Braf giocano un ruolo chiave nella patogenesi di diverse neoplasie (Johansson e Brage, 2014)

La forma piu' comune in medicina umana di mutazione BRAF, osservata in circa l'80-95 %, si osserva attraverso la sostituzione dell'aminoacido Valina con l'acido glutammico a carico del codone 600. Viene quindi indicata dalla sigla (V600E). In medicina umana si riscontra tale mutazione in 40% dei melanomi cutanei (DeVita et al, 2015; Sullivan e Flaherty, 2013; Roskoski, 2010).

In medicina veterinaria si parla di mutazione BRAF V595E, una mutazione missenso ortologa a quella umana.

Analizzando le percentuali di frequenza di mutazione del gene BRAF nelle principali tipologie di cancro del cane, si nota come essa raggiunga punte dell'80% nei carcinomi uroteliali e prostatici. Può essere quantificata una sua in un 20% la sua frequenza sul totale delle neoplasie canine (Mochizuki e Breen; 2016).

Se confrontiamo il ruolo della mutazione BRAF V600 tra il melanoma umano e canino, vediamo che nel primo si parla di riscontro di mutazioni in un 40-50% dei casi, mentre nel cane andiamo dal 2 al 4% a seconda della localizzazione, orale o cutanea, della neoplasia ((Mochizuki e Breen; 2016; Sullivan e Flaherty, 2013).

Nel 2015 Decker et al, in uno studio basato su 62 casi di TCC del cane, mette in evidenza come nel 87% dei casi la mutazione di BRAF, omologa a quella umana. Tale mutazione era riscontrabile anche in tutti i sedimenti urinari che mostravano la mutazione (Decker et al, 2015)

Ancora la mutazione BRAF è stata cercata e trovata, tramite una droplet digital PCR, anche nel DNA di campioni urinari cani in cui è stato diagnosticato, un carcinoma uroteliale delle vie urinarie e nel carcinoma prostatico (Mochizuki et al, 2015).

Se analizziamo la medesima situazione in medicina umana, dove la presenza della mutazione BRAF è stimata intorno al 10 %, con punte del 80% in alcune tipologie di melanoma e di più del 97 % nella leucemia a cellule cappingate, la presenza di tale mutazione è di raro riscontro nel carcinoma uroteliale (Falini et al, 2018; Zaravinos et al, 2011; Davies et al, 2002; Boulalas et al, 2009)

L'importanza della ricerca di tale mutazione ha anche un'importanza da un punto di vista terapeutico. Infatti la mutazione è il target del farmaco Vemurafenib, che ha mostrato un'efficacia superiore rispetto alle tradizionali molecole (dacarbazina) nel trattamento del melanoma metastatico. Tuttavia, anche in corso di questa terapia possono insorgere rapidi meccanismi di resistenza, che portano a tempi di sopravvivenza libera da progressione variabili dai 5 ai 7 mesi (Rastrelli et al, 2014).

PARTE SPERIMENTALE

CAPITOLO OTTO

8 Materiali & metodi e risultati

In questo studio abbiamo valutato il ruolo dell'angiogenesi neoplastica in corso di carcinoma transizionale vescicale o uroteliale (TCC) del cane. L'evidenza di un ruolo importante della neoangiogenesi in questa neoplasia supporterebbe il razionale d'impiego di farmaci in regime metronomico. E' noto per quanto precedentemente esposto che l'efficacia della terapia metronomica è subordinata alla efficacia nel contrasto dei meccanismi in essere di neoangiogenesi tumorale. Riferimenti aneddotici suggeriscono che tale terapia possa dare risultati incoraggianti nel trattamento di questa neoplasia nel cane.

Per valutare il ruolo dell'angiogenesi è stata misurata la concentrazione urinaria di VEGF nonché l'attività gelatinasica delle Metalloproteinasi MMP-2 e MMP-9 di cani affetti da carcinoma transizionale e di cani sani.

I motivi che hanno portato a scegliere la valutazione di tali molecole in campioni urinari rispetto all'indagine immunoistochimica sono diversi: in primo luogo il campionamento biotico di tale neoplasia non è scevro di rischio di disseminazione metastatica iatrogena, come dimostrato in letteratura (Reed et al, 2013; Vignoli et al, 2007).

Inoltre, la tecnica zimografica da urine, oltre ad essere ben collaudata (Gentilini et al, 2005) consente di valutare l'attività delle gelatinasi e non solo la loro presenza tissutale. Infine, sebbene non fosse obiettivo

di questo lavoro che per la sua natura retrospettiva presenta limiti nella disponibilità delle matrici, l'impiego delle urine consentirebbe un approccio diagnostico, prognostico e di monitoraggio delle terapie non invasivo.

Lo studio retrospettivo monocentrico si è basato su campioni provenienti da cani afferenti al servizio di medicina interna veterinaria della clinica veterinaria privata "San Marco" di Padova.

Infine, i valori ottenuti nei pazienti neoplastici, sono stati messi in relazione a parametri clinici ed in particolare allo stadio della patologia, al trattamento ed alla sopravvivenza dei pazienti.

8.1 Contributo casistico e descrizione del campione

Sono state analizzate le urine di 15 cani affetti da carcinoma uroteliale, diagnosticato istologicamente /citologicamente, afferenti al servizio oncologico della clinica San Marco tra il dicembre 2004 e il novembre 2015 e le urine di 16 cani sani (ossia i cui parametri rientravano negli intervalli di riferimento del medesimo laboratorio) afferenti al servizio di medicina interna della medesima clinica dal settembre 2015 al settembre 2016.

Dopo le analisi di routine, tutti i campioni urinari sono stati conservati congelati fino agli ulteriori accertamenti mediante analisi zimografica, e misurazione del VEGF.

Il gruppo dei 16 cani sani era costituito da 10 cani maschi, di cui 5 sono risultati castrati, e 6 cagne femmine, di cui 5 sono risultate sterilizzate. Le razze presenti nello studio erano così rappresentate : Labrador Retriever (2), West Highland White Terrier (2), Golden Retriever (1), Alaskan Malamute (1), Barbone nano (1), Shiba Inu (1),

Maltese (1), Pastore tedesco (1), Siberian Husky (1), Pitt Bull (1), Meticcio (4).

L' eta' dei soggetti era compresa tra i 3 ed i 10 anni, con una eta' media di 6,2 anni.

Dei 14 cani affetti da TCC essi erano costituiti da 4 soggetti maschi, di cui uno solo castrato, e di 11 femmine, di cui 10 sterilizzate. Le razze rappresentate nello studio sono state: Scottish Terrier (2), Lagotto romagnolo (1), Fox Terrier (1), Beagle (1), Schnautzer gigante (1), Labrador retriever (1), Meticcio (8). L' eta' media era di 10,8 anni.

Le diagnosi sono state effettuate per la maggior parte tramite indagine istologica, mediante prelievo biotico per via endoscopica (13 casi) e in 2 casi la diagnosi e' stata ottenuta con un esame citologico, ottenuto per cateterismo traumatico.

Di questi pazienti 10 erano in possesso di un esame di tomografia assiale computerizzata eseguita in corso di stadiazione

Tra gli animali affetti da TCC, ove i dati erano disponibili, sono stati sottoposti a stadiazione secondo lo schema **TNM**

In base a questo schema classificativo il TCC viene suddiviso in

T: dimensioni del tumore

Tis: carcinoma in situ

T0 non evidenza di tumore primario

T1 tumore superficiale papillare

T2 tumore con invasione della parete vescicale

T3 tumore che invade gli organi adiacenti

N:Linfonodi regionali (iliaci interni ed esterni)

No assenza di interessamento linfonodale

N1 interessamento dei linfonodi regionali

N2 interessamento sia dei linfonodi regionali che iuxtaregionali

M: metastasi a distanza

M0 nessuna evidenza di metastasi

M1 presenza di metastasi a distanza

Dei 14 cani affetti da TCC, 1 soggetto risultava Tis/No/Mo, 5 cani sono risultati T1/No/Mo, 5 cani T2/No/M0, 2 cani T3/N0/M0, 2 cani T3/N1/M0

Per quanto riguarda la stadiazione ci si è basati sull'esito dell'esame istologico per valutare la capacità localmente infiltrante della neoplasia, sull'ecografia addominale e sulla ricerca delle metastasi polmonari e/o ossee tramite radiologia tradizionale o esame TC. Quasi sempre il campione biotico è stato ottenuto durante procedura di cistoscopia.

Per quanto riguarda la terapia, sono rappresentati 4 casi in cui alla diagnosi non è seguito nessun protocollo terapeutico, o per scelta di effettuare l'eutanasia o per scelta personale del proprietario. In 8 casi si è proceduto alla somministrazione di Piroxicam (0,3 mg/kg SID), da solo o in associazione a regime chemioterapico tradizionale. 8 cani hanno ricevuto agenti antineoplastici tradizionali, dal mitoxantrone (risultato somministrato in un numero variabile di cicli al dosaggio di 5 mg/m²) effettuato in 5 cani, al Carboplatino (300 mg/m²) somministrato a 3 cani, e Vinblastina (1 solo cane).

8.2 Raccolta, conservazione e processazione delle urine

I campioni di urina dei pazienti sani sono stati prelevati per cistocentesi.

Per ogni paziente sono stati raccolti almeno 5 mL di urina in una siringa sterile

I campioni di urina dei pazienti affetti da TCC è avvenuta mediante cateterismo e in X casi per minzione spontanea.

La procedura alla quale sono stati sottoposti i campioni è stata standardizzata come segue:

- processazione del campione entro trenta minuti dalla raccolta o, quando non è stato possibile, il campione è stato mantenuto ad una temperatura di +4°C per un periodo non superiore alle 4 ore;

- suddivisione del campione in due aliquote

- esame chimico-fisico e del sedimento urinario di un'aliquota

- stoccaggio delle aliquote a -20°C per le successive determinazioni (valore del VEGF e e MMP-2 e MMP-9);

- determinazione delle proteine totali urinarie con

 - metodo colorimetrico al rosso di pirogallolo (Urinary/CSF Protein OSR6170 Olympus system reagent);

- Analisi zimografica e immunoenzimatica ELISA.

8.3 Tecniche immunoenzimatiche: ELISA per la valutazione del VEGF urinario

8.3.1 Materiali e metodi

La concentrazione di VEGF urinario e' stata misurata utilizzando un ELISA kit commerciale per la misurazione di VEGFa nella specie canina (LS-F4444, LifeSpan Biosciences , Seattle, Wa, USA) utilizzabile sia su siero che urine, seguendo le istruzioni annesse al kit. (Figura 41)



FIGURA 41: KIT ELISA-SANDWICH UTILIZZATO PER LA MISURAZIONE DI VEGFA CANINO NELLE URINE

Il kit ha un *range di Detection* tra 15.63 e 1000 pg/mL e una sensibilità analitica comunque inferiore a 15.63 pg/mL. La precisione del kit è riferita a coefficienti di variazione Intra-Assay CV <10% e Inter-Assay <12%).

Ciascun campione è stato analizzato in duplicato ed il risultato espresso come media \pm SD.

Il saggio è un ELISA-sandwich che utilizza una detection colorimetrica con 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) come rilevatore di perossidasi (HRP) (Figura 42)

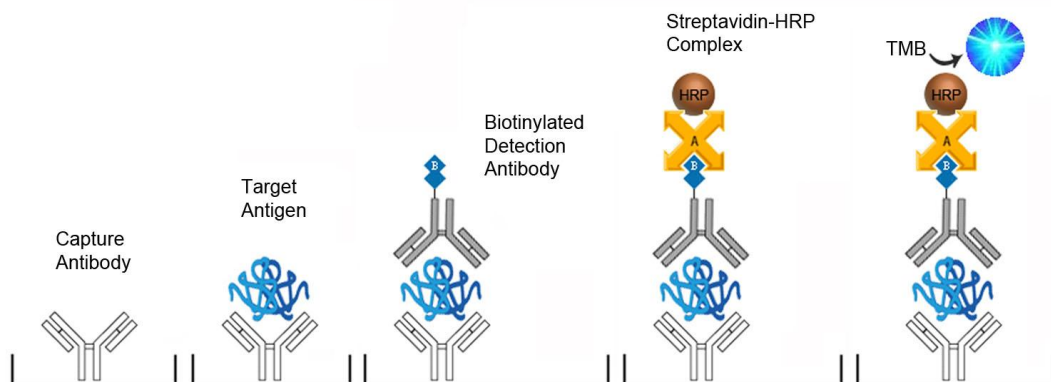


FIGURA 42: PRINCIPIO DI ANALISI ELISA-SANDWICH PER LA QUANTIFICAZIONE DI VEGF NELLE URINE DI CANE

Il metodo è descritto in breve. Per i dettagli si rimanda alle istruzioni del kit.

Dopo aver equilibrato tutti i reagenti a temperatura ambiente, 100 μ L di Standard, Bianco o campione sono stati aggiunti a ciascun pozzetto coperti ed incubati a 37°C per 1 h. Poi il liquido è stato aspirato e sono stati aggiunti a ciascun pozzetto 100 μ L di reagente A. La piastra è stata agitata delicatamente per assicurare di mescolare adeguatamente e poi è stata incubata nuovamente a 37°C per 1h. Successivamente, è stato aspirato il liquido da ciascun pozzetto e sono stati eseguiti tre lavaggi con il tampone di lavaggio 1X. Ciascun lavaggio è stato eseguito aggiungendo 350 μ L di tampone di lavaggio, lasciando agire per 2 minuti e aspirando il contenuto di ciascun pozzetto. La piastra è stata poi delicatamente capovolta e battuta delicatamente contro carta assorbente per garantire l'eliminazione del tampone di lavaggio. Sono stati aggiunti a ciascun pozzetto 100 μ L di reagente B incubando per 30 minuti a 37°C. Si è poi provveduto a lavare ciascun pozzetto per 5 volte come indicato in precedenza e sono stati aggiunti 90 μ L di TMB incubando per 20 minuti a 37°C. Infine, è stata letta l'assorbanza a 450 nM.

8.3.2 Risultati

Il saggio ha rilevato VEGFA in 1/16 campioni di animali sani e in 10/15 cani affetti da TCC. I valori di VEGF sono molto variabili ma tutti all'interno della curva standard. Il valore di VEGF più basso è di circa 31 pg/mL mentre quello più alto è di 508 pg/mL. I risultati analitici complessivi sono riportati in Tabella A.

Cani sani di controllo																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
VEGF (pg/mL)	ND	ND	ND	ND	20,7±2,5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Cani affetti da TCC																
	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	
VEGF (pg/mL)	184,4 ±21,9	82,6 ±1,4	508,4 ±138,4	31,7 ±20,5	ND	72,4 ±25	ND	N D	63,7 ±2,1	ND	79,2 ±0,9	317,1 ±0,7	94,9 ±1,4	N D	86,1 ±6,8	

Tabella A: Concentrazioni urinarie di VEGF nelle urine di cani sani (in alto) e affetti da TCC (in basso).

Le concentrazioni di VEGF sono state sottoposte ad analisi statistica mediante test non parametrico U-Mann Whitney. La differenza di concentrazione è risultata statisticamente significativa (Figura 43).

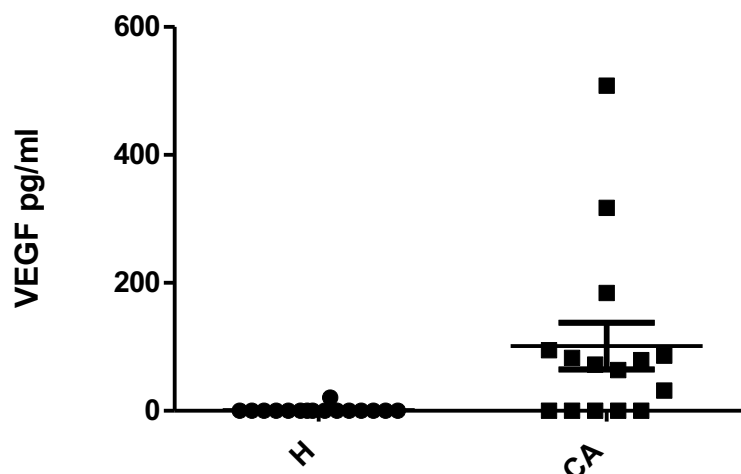


FIGURA 43: DOT-PLOT DELLE CONCENTRAZIONI DI VEGF NELLE URINE DI CANI SANI (H) E AFFETTI DA TCC (CA).

I dati VEGF sono stati poi normalizzati utilizzando la creatinina urinaria (Mohammed et al., 2003) ed espressi come pg di VEGF per gr di creatinina e rianalizzati con test U di Mann-Whitney con risultati analoghi ai precedenti.

	Cani sani di controllo															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
VEGF (pg/g_crea)	ND	ND	ND	ND	110.7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

	Cani affetti da TCC														
	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53
VEGF (pg/g_crea)	3415	397	4133	932	ND	428	ND	ND	ND	ND	377	5662	192	ND	574

Tabella B: Concentrazioni urinarie di VEGF nelle urine di cani sani (in alto) e affetti da TCC (in basso) normalizzati per g di creatinina urinaria.

8.4 Zimografia su gel per la determinazione dell'attività delle gelatinasi (MMP-2 e MMP-9) canine urinarie

8.4.1 Materiali e metodi

Il contenuto urinario di metalloproteinasi 9 e 2 (MMP-9 e MMP-2), sia nella forma proenzimatica che in quella attiva, è stato misurato in zimografia apportando alcune modifiche a quanto precedentemente descritto (Gentilini F et al. 2005). In breve, l'attività di MMP-9 e di MMP-2 è stata analizzata su gel precasted "Novex 10% Zymogram Gelatin Gels", contenenti poli-acrilammide, Tris-Glicina al 10% e gelatina allo 0,1% (Invitrogen U.K.). 5 µL di ciascun campione sono stati mescolati con un volume uguale di tampone di caricamento "Tris-Glycine SDS Sample Buffer 2X" (Invitrogen U.K.) e caricati nei pozzetti dei gel. L'elettroforesi è stata eseguita per 90 minuti a voltaggio costante (125 V) in tampone di corsa "Novex Tris-Glycine SDS Running Buffer" (Invitrogen U.K.). Contemporaneamente ai campioni, sullo stesso gel, è stato fatto correre uno standard di MMP-2 e MMP-9 di derivazione umana (Chemicon International, CA, USA). Dopo l'elettroforesi, i gel sono stati incubati per 30 minuti con la soluzione di rinaturazione 1X "Zymogram Renaturing Buffer" (Invitrogen UK), equilibrati a temperatura ambiente per 30 minuti infine incubati a 37 ° C per 48 ore nella miscela di sviluppo 1X "Zymogram Development Buffer" (Invitrogen UK). L'incubazione prolungata in miscela di sviluppo è stata effettuata al fine di aumentare la sensibilità del test, specialmente per MMP 2, che ha dimostrato avere, in tutti i casi esaminati, attività ridotta rispetto a MMP 9. Le bande relative ad enzimi con attività gelatinolitica sono state rivelate dopo colorazione dei gel per 1 ora con "Simply Blue™

Safe Stain” (Invitrogen UK) e decolorazione in acqua deionizzata. Le bande corrispondenti alle MMP9 e MMP2 canine, sono state identificate sulla base del peso molecolare di circa 92 e 68 kDa rispettivamente, come descritto da Bergman et al. e da Leibman et al. L’acquisizione delle immagini relative ai gel è stata effettuata con lo strumento “ChemiDoc TM Imaging System” (Bio-Rad, CA, USA) a cui è seguita l’analisi densitometrica delle bande di interesse con un software apposito (Image Lab, Bio-Rad). I dati risultanti sono stati espressi come unità arbitrarie (AU).

8.4.2 Risultati

L’analisi zimografica, sebbene lunga ed indaginoso, è risultata affidabile e riproducibile come riportato in letteratura (Gentilini et al ,2005). I coefficienti di variazione medi sono risultati inferiori al 15%, di t. Tutte le bande gelatinolitiche sono state facilmente identificate (figura 44).

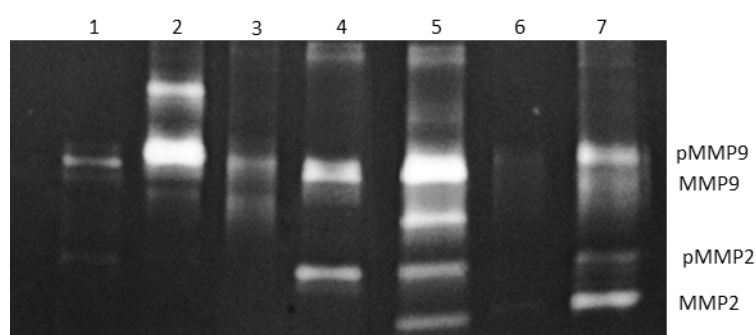


Figura 44: risultati rappresentativi dell’ analisi zimografica da urine: corsie 1-5: cani affetti da TCC; corsia 6. cane sano; corsia 7: standard MMPs umano

L’analisi densitometrica ha poi consentito di quantificare le diverse bande. I risultati complessivi sono riportati nella tabella sottostante (Tabella C).

ID	proMMp-9	aMMP-9	proMMp-2	aMMP-2	MMP-totale
1	4964041	0	1036675	0	6000716
2	4726071	0	0	0	4726071
3	198132	0	0	0	198132
4	0	0	0	0	0
5	20325457	0	8211270	2944000	31480727
7	1488692	0	0	0	1488692
9	325620	0	0	0	325620
10	24318608	602669	0	0	24921277
11	1193710	0	843098	0	2036808
12	6963266	0	3574660	0	10537926
13	2102440	0	0	0	2102440
14	346795	0	743369	0	1090164
15	2681721	0	0	0	2681721
16	1272882	0	638686	0	1911568
17	12316006	0	0	0	12316006
18	2846844	673620	2731712	847979	7100155
media	5379393	79768	1111217	236999	6807376
SD	7366161	218352	2170324	752219	9183729
39	4823586	3437614	0	0	8261200
40	13849103	0	4898031	0	18747134
41	34793430	10301351	9107029	11771700	65973510
42	15005692	5471214	5336928	0	25813834
43	12609926	0	4604602	0	17214528
44	2910158	0	0	0	2910158
45	5447433	1054679	0	0	6502112
46	22352208	0	5673545	14215984	42241737
47	7434742	0	2339072	0	9773814
48	12472460	0	1880637	0	14353097
49	31724626	12050027	3939228	4539534	52253415
50	19523261	6473706	4944488	2968189	33909644
51	341497	0	30741	0	372238
52	28303582	0	8626382	36291961	73221925
53	5032723	0	2864824	0	7897547

media	14441628	2585906	3616367	4652491	25296393
SD	10837002	4103917	2978823	9865184	23264291

Tabella c: risultati complessivi dell'analisi densitometrica zimografica. In verde i campioni di i soggetti sani, in rosso quelli di soggetti affetti da TCC

I risultati evidenziano una netta differenza tra i campioni urinari dei soggetti sani e dei soggetti affetti da TCC. I dati sono stati sottoposti ad analisi statistica con test per dati non parametrici U di Mann-Whitney. Per tutte le componenti sia proforma sia attivate di MMP2 e di MMP9 è stata evidenziata una maggiore attività gelatinolitica nei soggetti affetti da TCC rispetto ai soggetti sani (Figura 45).

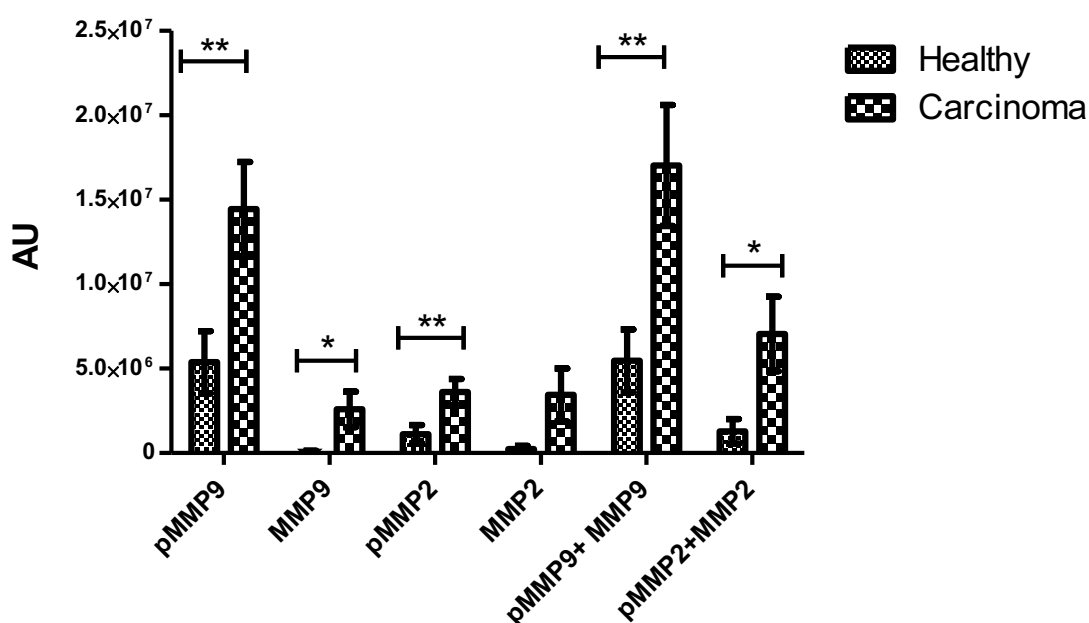


Figura 45: istogrammi relativi alle analisi densitometriche dell'attività gelatinolitica; pmmp9 e pMMP2: proforma enzimatica; mmp9 e mmp2: forma attivata. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; AU: unità arbitraria di densità misurata. Mann-Whitney U test

8.5 Analisi mutazionale BRAF

In 10 casi di TCC è stato possibile condurre l'analisi mutazionale somatica dell'esone 15 (ENSCAFE00000042513) del gene BRAF di cane.

8.5.1 Materiali e metodi

Il DNA è stato estratto da sezioni istologiche delle neoplasie utilizzando l'estrattore automatico Maxwell® RSC 48 con kit specifico per tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (Maxwell® RSC DNA FFPE Kit, Promega). Il target è stato amplificato mediante PCR con Taq Phusion e sequenziato con primer forward e reverse per evidenziare la mutazione V600E. L'analisi è stata condotta da un laboratorio esterno.

8.5.2 Risultati

La mutazione c.1763T>A è stata identificata in 9/10 dei casi esaminati (Figura 46) confermando il ruolo cruciale nella cancerogenesi di TCC del proto-oncogene BRAF (Decker et al, 2015).

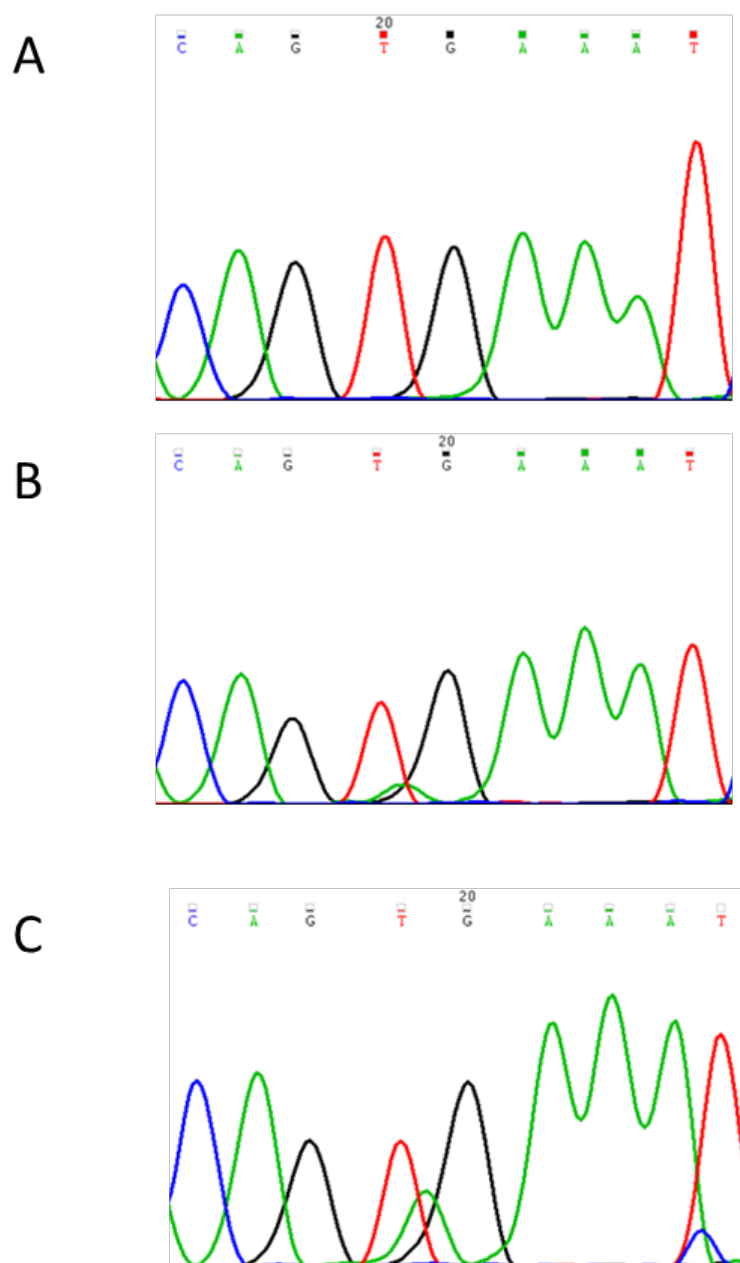


Figura 46: Cromatogrammi dell'analisi mutazionale del gene BRAF: A campione non mutato, B e C campioni mutati c.1763T>A

I risultati in relazione ad altri parametri clinici e clinicopatologici completi sono riportati in Tabella D

I D	razza	tipo diagno	stadio	terapia	mutazion e BRAF
--------	-------	----------------	--------	---------	--------------------

si					
3		istologi	T2/N0/M		
9	Meticcio	ca	o	Piroxicam	positivo
4		istologi	T2/N0/M		
0	Meticcio	ca	o	Mitoxantrone (5 x) Carboplatino(2X)	positivo
4		istologi	T3/n0/M		
1	Meticcio	ca	0	Mitoxantrone (1x) + Metacam	positivo
4		citologi	T3/N1/M		
2	Meticcio	ca	0	nessuna	
4	Scottish	istologi	T2/N0/M		
3	Terrier	a	o	Metacam. cistectomia	positivo
4		istologi	T2/N0/M		
4	Lagotto	a	o	cistectomia. piroxicam. Mitoxantrone (6 x)	positivo
4		istologi	T2/N0/M		
5	Meticcio	a	o	Vinblastina (4x). piroxicam	positivo
4		istologi	T1/N0/M		
6	Meticcio	a	o	carboplatino (1x)	negativo
4	Scottish	citologi	T1/N0/M		
7	Terrier	ca	o	nessuna	
4		istologi	T1/N0/M		
8	Fox Terrier	a	o	nessuna	
4		istologi	T3/n1/M		
9	Beagle	ca	0	nessuna	
5	Alaskan	istologi	T1/N0/M		
0	Malamute	ca	o	piroxicam	
5	Labrador	istologi	T3/n0/M		
1	Retriever	ca	0	piroxicam	positivo
5		istologi	Tis/No/M	mitoxantrone (2x). Carboplatino (3 x).	
2	Meticcio	ca	o	Feldene . citoriduzione laser	positivo
5		istologi	T1/N0/M		
3	Meticcio	ca	o	piroxicam. mitoxantrone	positivo

Tabella D: analisi della mutazione somatica V600E di TCC nel cane.

8.6 Analisi statistica

I dati sono stati sottoposti ad ulteriori indagini statistiche. In particolare I dati clinici sono stati correlati mediante regressione logistica con variabile dipendente la categoria sano/affetto da TCC e come predittori i dati di segnalamento sesso, intero/castrato età e il dato clinico del peso.

Il modello che meglio descrive la popolazione di soggetti affetti da TCC include Età, sesso e peso dell'animale. I dettagli sono elencati nella seguente tabella E.

Logistic regression casi = 31; Log likelihood = -8.1539436; **Pseudo R2 = 0.6202**

	Odds ratio	ST error	p	95% Intervallo di confidenza
Peso (kg)	0.92	0.05	0.169	0.83 - 1.03
Età (anno)	2.50	0.87	0.008	1.27 - 4.93
Sesso (M/F)	4.12	5.56	0.295	0.29 - 58.09

Tabella E: Modello di regressione logistica elaborato su 31 casi complessivi tra controlli sani e soggetti affetti da TCC.

Ogni anno di età è associato significativamente ad un incremento del rischio di 2.5 volte di risultare affetti da TCC. Le femmine sembrano essere maggiormente esposte all'insorgenza con un Odds ratio superiore a 4 così come cani di peso inferiore sebbene in entrambi i casi non si raggiunge la significatività statistica.

L'analisi statistica è stata, inoltre, rivolta ad approfondire le relazioni tra le diverse molecole ad attività angiogenica. A tal fine sono stati calcolati i coefficienti r di Spearman e la loro significatività statistica. L'analisi è stata condotta sui 15 casi di cani affetti da TCC.

I dati sui tutti i 31 soggetti sono riportati nella Tabella F.

	VEGF	proMMP9	aMMP9	proMMP2	aMMP2
VEGF	1				
proMMP9	0.39 p=0.15				
aMMP9	0.70 P<0.01	0.66 P<0.01			
proMMP2	0.35 P=0.21	0.87 P<0.001	0.36 P=0.18		
aMMP2	0.03 P=0.93	0.63 p=0.01	0.03 p=0.93	0.68 P<0.01	
MMP tot	0.35 P=0.20	0.96 P<0.001	0.54 p=0.04	0.88 P<0.001	0.81 P<0.001

Tabella F: Correlazioni come coefficiente r di Spearman e relativo valore di p delle molecole angiogeneiche in urine di cani affetti da TCC (n=15)

Si può osservare come nei soggetti affetti da TCC la concentrazione di VEGF urinaria sia correlata solo all'attività di aMMP9. Si può pertanto ipotizzare che le stesse cause che agiscono per attivare MMP9 determinano una maggior concentrazione di VEGF. La forma attivata di MMP9, inoltre, correla anche con la sua proforma inattiva.

E' plausibile pertanto che che i meccanismi di attivazione siano attivati parallelamente ai meccanismi che ne inducono l'aumento di espressione. Inoltre, le forme attivate di MMP2 e 9 non sono minimamente correlate a probabile testimonianza di meccanismi di induzione diversi mentre le concentrazioni delle proforme inattive di MMP2 e 9 sono significativamente correlate che probabile esito di meccanismi sovrapposti di induzione.

CAPITOLO NOVE

Discussione e conclusioni

I risultati del nostro studio supportano in modo convincente l'ipotesi che l'angiogenesi sia un meccanismo fondamentale nella patogenesi e nel comportamento biologico del carcinoma a cellule transizionali vescicali del cane e che, di conseguenza, essa possa rappresentare un nuovo target terapeutico per applicare o sviluppare nuovi trattamenti di questa patologia.

Diverse evidenze scientifiche indicano nell' angiogenesi tumorale un fattore chiave nella crescita e nell' acquisizione di un fenotipo metastatico da parte della cellula tumorale. (Folkman et al, 2001).

Sia in medicina umana che veterinaria, le molecole angiogeniche VEGF e Gelatinasi (MMP-2 e MMP-9) sono risultate fattori chiave nell'angiogenesi neoplastica e la loro misurazione ha permesso di acquisire importanti informazioni circa il comportamento di tali patologie (Giger et al, 2017; Mahecha e Wang, 2017; Folkman, 2008).

L'esplorazione del potenziale angiogenico nei tessuti patologici può essere, infatti, condotta con diversi approcci e metodologie.

In medicina veterinaria queste metodiche sono state applicate su diverse tipologie neoplastiche e diverse matrici; in particolare alcuni autori hanno studiato l'angiogenesi direttamente nel tessuto neoplastico del cane (linfomi, meningiomi, mastocitomi, seminomi, tumori mammari, carcinoma tiroideo) andando a valutare VEGF e/o suoi recettori (Santos et al, 2016; Giantin et al, 2013; Campos et al, 2014; Wolfesberger et al, 2007; Platt et al, 2006; Mederle et al, 2010; Santos et al, 2010; Matiassek et al 2009; Millanta et al, 2006; Restucci

et al, 2002) o le MMP nei tumori venerei trasmissibili del cane, nel linfoma canino, nei tumori mammari e nel mastocitoma del cane (Akkoc et al, 2017; Arico' et al, 2013; Giantin et al, 2012; Aresu et al, 2011).

Altri autori hanno indagato i meccanismi angiogenici utilizzando i liquidi organici quali plasma, siero, urine, liquido cefalorachidiano e versamenti cavitari (Turba et al, 2007; Gentilini et al, 2005; Clifford et al, 2002; Lazarous et al, 1999).

Anche nei sarcomi dei tessuti molli del cane la valutazione del ruolo dell' angiogenesi tumorale è stata condotta attraverso lo studio di VEGF e dei suoi recettori (Al Dissi et al, 2009; De Queiroz et al, 2010; Avallone et al, 2015).

Clifford e coll. (2001) hanno confrontato i livelli plasmatici circolanti di VEGF in cani sani e cani affetti da emangiosarcoma splenico, dimostrando in questi ultimi valori significativamente superiori. La presenza di VEGF e dei suoi recettori è stata inoltre dimostrata con metodica immunoistochimica dal lavoro di Yonemaru e coll. (2006).

In un lavoro recente i cani affetti da patologie spleniche sia maligne che benigne (emangiosarcomi ed ematomi) presentavano valori di VEGF sierico più elevati rispetto ad un gruppo di cani sani. Tuttavia, i cani non è stata dimostrata alcuna differenza tra i soggetti con patologie maligne rispetto a quelli con patologie benigne (Frenz et al, 2014). Questo riscontro contrasta con l'ipotesi che il fenotipo angiogenico rappresenta uno step di malignità. Evidentemente le lesioni vascolari presentano connotati angiogenici indipendentemente dalla malignità o benignità del comportamento biologico. Possiamo considerare queste lesioni come eccezioni che confermano la regola.

Recenti studi in medicina veterinaria hanno avvalorato il ruolo cruciale nella patogenesi neoplastica delle metalloproteinasi, sebbene in letteratura i dati non siano sempre concordanti. In particolare alcuni studi evidenziano una correlazione tra alti valori di MMP 2 e MMP 9 con una prognosi peggiore, mentre altri non hanno evidenziato nessun ruolo prognostico a queste molecole (Pulz e Strefezzi, 2016).

Una possibile spiegazione di dati contrastanti è che la flogosi che caratterizza il microambiente tumorale può essere in grado, secondo alcuni, di aumentare il livello di gelatinasi anche in lesioni neoplastiche benigne di diverse tipologie neoplastiche (Miya et al, 2005).

Ad esempio, nell' analisi della MMP 9 nel liquido cerebrospinale di cani affetti da neoplasia intracranica, gli elevati livelli di questa molecola sono stati ricondotti alla presenza della componente flogistica, ossia dell' infiltrato leucocitario richiamato dalla neoplasia (Turba et al, 2007).

Le neoplasie in cui queste molecole sono state indagate maggiormente sono i carcinomi mammari, i tumori oronasali ed il mastocitoma (Pulz e Strefezzi, 2016).

In particolare nei tumori mammari il ruolo delle gelatinasi risulta controverso (Pulz e Strefezzi, 2016).

Secondo autori nel contesto di lesioni mammarie maligne hanno evidenziato un'attività più elevata di MMP-9 nelle lesioni maligne rispetto a quelle benigne (Hirayama et al ,2002).

Una conferma del ruolo di MMP-9 come indice di malignità è stato avvalorato anche dal suo rapporto di diretta proporzionalità con il Ki-

67, indice questo di attività di proliferazione cellulare (Nowak et al, 2008).

Altri Autori hanno posto i livelli di MMP-2 come un marker specifico di neoplasia mammaria maligna, in particolare andando ad analizzare i maggiori livelli di questa molecola che si riscontrano sia nel tessuto mammario sano che nei fibroblasti che si associano alla proliferazione neoplastica (Paparella et al, 2002; Aresu et al, 2011).

Anche nel mastocitoma del cane MMP9 è direttamente correlata al grado della neoplasia e può assumere valore prognostico (Giantin et al, 2012).

Al contrario, nei tumori encefalici, con particolare riferimento al meningioma nel cane e nel gatto l'attività gelatinolitica non è risultata correlata al grado di malignità (Mandara et al, 2009).

Anche nelle neoplasie ematopoietiche, in particolare nel linfoma, il riscontro di elevati livelli sierici di VEGF e MMP-9 è stato messo in correlazione con l'angiogenesi neoplastica (Gentilini et al, 2005).

Sempre nel linfoma il ruolo delle MMPs appare controverso. Secondo Newman la MMP 2 è correlata al grado istologico, mentre Aresu e coll., hanno evidenziato un ruolo prognostico di MMP 9 nella risposta terapeutica in cani sottoposti a regime chemioterapico (Aresu et al, 2014; Newman et al 2008).

Nel carcinoma a cellule transizionali vescicale del cane (TCC), la possibilità di esplorare il potenziale angiogenico tramite molecole presenti nell'urina risponde sia ad un criterio di economicità, ma è anche imposto dal rischio di disseminazione metastatica che questa neoplasia mostra in seguito a tecniche di biopsia tradizionali (Reed et al, 2012; Vignoli et al, 2007).

In medicina umana, dove troviamo una ben più' cospicua mole di lavori, il lavoro capostipite è rappresentato da "Vascular endothelial growth factor: an important angiogenic mediator in bladder cancer." di Crew, che nel 1999 poneva l' attenzione al ruolo di VEGF, misurato anche nelle urine, come molecola chiave nel ruolo dell' angiogenesi in questa neoplasia. Sempre uno studio dello stesso autore ha dimostrato che valori elevati di VEGF nelle urine di pazienti con carcinoma della vescica fossero correlati con più elevati tassi di recidiva del tumore.

Inoltre la misurazione di VEGF nell' urina di pazienti affetti da neoplasia vescicale sembra possa essere un indicatore predittivo del rischio di progressione dei tumori superficiali della vescica (Chabbannes et al, 2001).

Il VEGF urinario escreto dal carcinoma vescicale dell' uomo, può essere meglio interpretato se normalizzato alla creatinina urinaria . Così normalizzato, il dato è stato in grado di predire la recidiva della neoplasia stessa (Jeon et al ,2001).

Analoghi risultati sono stati ottenuti anche valutando il livello di VEGF nel siero di pazienti affetti da TCC (Beecken et al , 2005;Theodoropoulos et al, 2004).

In medicina umana particolare attenzione è stata posta al rilievo delle gelatinasi (MMP 2 e MMP 9) tramite tecnica zimografica nelle urine di pazienti affetti da carcinoma vescicale. In particolare si è posta attenzione al loro ruolo nella progressione e nella guida del processo metastatico (Di Carlo, 2006; Gerhards et al ,2001; Monier et al, 2000; Sier et al, 2000; Bianco et al, 1998).

Le MMP urinarie sono , in medicina umana , un valido marker per l'identificazione del carcinoma vescicale , anche se non forniscono

dati circa l'esatto istotipo della neoplasia presente in vescica (Mohammed et al, 2013).

Nell'uomo molteplici lavori hanno evidenziato che le MMP possono essere rilevate in campioni di urina prelevati da pazienti affetti da tumore della prostata e della vescica e che esse siano predittori indipendenti dello stato di malattia (Mohamed et al, 2013; Vasala et al, 2007; Wu Z-S et al, 2008).

Anche in ambito veterinario ed in particolare in nefrologia veterinaria le gelatinasi hanno suscitato interesse; tuttavia il numero di lavori è sicuramente più esiguo. (Liu et al, 2012; Aresu et al, 2011; Mancini D., 2008).

In particolare, il ruolo dell'angiogenesi nei carcinomi vescicali del cane, è stato studiato in due lavori (Mohammed et al, 2003; Schrempp et al, 2013). Nel primo è stato valutato l'impatto terapeutico dell'utilizzo di un protocollo chemioterapico a base di cisplatino e piroxicam sulla riduzione del volume tumorale, sull'apoptosi e sull'angiogenesi (Mohammed et al, 2003); in particolare, l'effetto antiangiogenico è stato valutato tramite la valutazione intralesionale della microvascular density (MVD) e alla determinazione del VEGF urinario (Mohammed et al, 2003). nel secondo è stato dimostrato che i TCC rispondono favorevolmente alla somministrazione in modalità metronomica dell'agente alchilante clorambucile. (Schrempp et al, 2013).

Molte evidenze dimostrano che la MVD è considerata l'indicatore più completo e accurato di angiogenesi. Inoltre, molti studi dimostrano che la MVD e il VEGF sono correlati. La valutazione della MDV può essere ottenuta sia attraverso metodiche immunoistochimiche che di

imaging diagnostico come l' ecografia (Pollard et al, 2017; Zhu et al, 2014; Ajili et al 2012).

La valutazione del VEGF urinario correla con la MVD ed è ritenuta rappresentativa dell'angiogenesi tumorale nel carcinoma a cellule transizionali della vescica nel cane (Pollard et al, 2017; Mohammed et al, 2002).

Riteniamo quindi che la scelta di valutare contemporaneamente VEGF e MMP-2 e MMP-9 urinarie identificando significativi incrementi e correlazioni nei cani affetti da TCC della vescica possa rappresentare un buon supporto all'ipotesi che l'angiogenesi abbia un importante ruolo nella patogenesi di questa neoplasia.

Tale affermazione trova ulteriore indiretto sostegno dalla favorevole risposta di questa neoplasia al trattamento farmacologico in modalità metronomica che, come ampiamente riportato in letteratura, esplica i propri effetti principalmente inibendo l'angiogenesi neoplastica (Cicchellero et al, 2017; Denies et al, 2017; Biller 2014; Schrempp et al, 2013 ; Marconato et al, 2011). E' anche esperienza dell'autore che alcune neoplasie con accertata fenotipo neoangiogenico rispondano in modo consistente e riproducibile al trattamento in regime metronomico (osservazioni personali). Fanno parte di questo bagaglio di esperienza personale alcuni casi di TCC trattati in modo metronomico con risultati apprezzabili.

Attualmente il protocollo utilizzato dall' autore prevede la somministrazione di 4/5 cicli di mitoxantrone seguito dalla somministrazione, in modalità metronomica, di piroxicam ,clorambucile e talidomide. In questo modo si ottiene una cronicizzazione della patologia, garantendo un'ottima qualità di vita ai

nostri pazienti mantenendo al contempo prolungati tempi di controllo della neoplasia.

Importanti e concreti sviluppi in campo terapeutico potrebbero essere favoriti dalla diffusione delle indagini molecolari finalizzate alla valutazione della mutazione somatica cBRAF V595E ortologa della mutazione umana BRAF V600E.

La sostituzione dell' aminoacido Valina con l'acido glutammico a carico del codone 600 rappresenta la variante piu' comune. Tale mutazione si riscontra nel 40% dei melanomi cutanei (Roskoski, 2010, Sullivan e Flaherty, 2013, DeVita et al, 2015) dove è stato dimostrato che guida lo sviluppo del processo metastatico). La stessa mutazione è stata identificata in misura molto inferiore anche in molti altri tumori quali carcinoma colon-retto, glioma, carcinoma tiroideo e carcinoma ovarico (Davies et al, 2002).

Nel carcinoma vescicale dell'uomo, tuttavia, tale mutazione risulta essere piuttosto infrequente (Boulalas et al, 2009).

Al contrario, nel carcinoma a cellule transizionali vescicale del cane, neoplasia che condivide diversi aspetti istologici, biologici e clinici con il carcinoma invasivo vescicale dell'uomo, tale mutazione risulta essere presente in circa l'85 % dei casi (Decker et al, 2015).

I nostri rilievi concordano con quanto descritto in letteratura poiché è stata identificata nel 90% dei casi esaminati.

In medicina veterinaria la mutazione è a carico del codone 595 che è l'ortologo della mutazione umana. È piu' corretto indicare nel cane la terminologia. cBRAF V595E, una mutazione missenso ortologa a quella umana.

La presenza di questa mutazione somatica getta le basi di possibili importanti sviluppi in campo terapeutico

La presenza della mutazione BRAF è la condizione razionale alla prescrizione della molecola Vemurafenib (ZELBORAF®).

Al momento della scrittura di questa tesi, a conoscenza degli Autori, non risulta nessun lavoro pubblicato in medicina veterinaria che abbia valutato l'utilizzo di questo farmaco nel trattamento del carcinoma a cellule transizionali vescicale del cane né per altre forme neoplastiche.

In conclusione possiamo affermare che i risultati di questo studio, corroborati da alcuni studi analoghi di altri autori, aprono alcune possibilità terapeutiche nel trattamento del carcinoma a cellule transizionali vescicale del cane. In particolare riteniamo sia sufficientemente supportato l'uso razionale di chemioterapia in regime metronomico caratterizzata da basso costo e scarsa tossicità. Meritano attenzione anche le molecole con attività specifica nelle neoplasie caratterizzate dalla mutazione BRAFV600E che potranno auspicabilmente essere introdotte in medicina veterinaria nel medio periodo.

BIBLIOGRAFIA

Al-Abd A.M., Alamoudi A.J., Abdel-Naim A.B., A. Neamatallah T.A. & Ashour O.M.

Anti-angiogenic agents for the treatment of solid tumors: Potential pathways, therapy and current strategies – A review

Journal of Advanced Research 8 (2017) 591–605 (2017)

Al-Dissi A. N., Haines D. M., Singh B. & Kidney B. A.

Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor in canine cutaneous fibrosarcomas.

Journal of Comparative Pathology, 141(4), 229-236. (2009)

Ajili F., Kacem M., Tounsi H., Darouiche A., Enayfer E., Chebi M., Manai M. & Boubaker S.

Prognostic impact of angiogenesis in nonmuscle invasive bladder cancer as defined by microvessel density after immunohistochemical staining for CD34.

Ultrastructural Pathology, 36(5), 336-342. (2012)

Akkoc A., Nak D., Demirer A. & Şimşek G.

Immunocharacterization of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in canine transmissible venereal tumors.

Biotechnic & Histochemistry, 92(2), 100-106. (2017)

Amadori D. & Croce C.M.

Terapia Molecolare in Oncologia

Poletto Editore (2005)

Amin M., Pushpakumar S., Muradashvili N., Kundu S., Tyagi S.C. & Sen U.

Regulation and Involvement of Matrix Metalloproteinases in Vascular Diseases

Front Biosci (Landmark Ed). (2016)

Arbiser J. L., Moses M. A., Fernandez C. A., Ghiso N., Cao Y., Klauber N., Frank D., Brownlee M., Flynn E., Parangi S., Byers H.R. & Folkman J.

Oncogenic H-ras stimulates tumor angiogenesis by two distinct pathways.

Proceedings of the National Academy of Sciences, 94(3), 861-866. (1997)

Aresu L., Aricò A., Comazzi S., Gelain M.E., Riondato F., Mortarino M., Morello E., Stefanello D. & Castagnaro M.

VEGF and MMP-9: biomarkers for canine lymphoma.

Veterinary and Comparative Oncology, 12(1), 29-36. (2014)

Aresu L., Benali S., Garbisa S., Gallo E. & Castagnaro M.

Matrix metalloproteinases and their role in the renal epithelial mesenchymal transition.

Histology and Histopathology, 26(1), 307. (2011)

Aresu L., Giantin M., Morello E., Vascellari M., Castagnaro M., Lopparelli R., Zancanella V., Granato A., Garbisa S., Aricò A., Decasto M., Mutinelli F. & Bradaschia A.

Matrix metalloproteinases and their inhibitors in canine mammary tumors.

BMC Veterinary Research, 7(1), 33. (2001)

Aricò A., Giantin M., Gelain M.E., Riondato F., Comazzi S., Rütgen B.C., Essler S.E., Dacasto M., Castagnaro M. & Aresu L.

The role of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinases in canine lymphoma: in vivo and in vitro study.

BMC Veterinary Research, 9(1), 94. (2013)

Arnold E.J., Childress M.O., Fourez L.M., Tan K.M., Stewart J.C., Bonney P.L. & Knapp D.W.

Clinical trial of vineblastine in dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder.

Journal of Veterinary Internal Medicine 25, 1385-1390. (2011)

Asnani A. & Peterson R. T.

The zebrafish as a tool to identify novel therapies for human cardiovascular disease.

Disease Models & Mechanisms, 7(7), 763-767. (2014)

**Avallone G., Stefanello D., Boracchi P., Ferrari R., Gelain M. E.,
Turin L., Tresoldi E. & Roccabianca P.**

Growth factors and COX2 expression in canine perivascular wall tumors.

Veterinary Pathology, 52(6), 1034-1040. (2015)

Azémar M.D., Comperat E., Richard F., Cussenot O. & Rouprêt M.

Bladder recurrence after surgery for upper urinary tract urothelial cell carcinoma: frequency, risk factors, and surveillance.

In Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations 29 (2), 130-136. (2011)

Bacon N.J. & Farese J.P.

Urinary Tract

Veterinary Surgical Oncology, Chapter 11, 365-382. Wiley-Blackwell ed. (2012)

Barone R.

Angiologia - parte prima cuore e arterie

Anatomia Comparata dei Mammiferi Domestici, vol. 5, pag XI. Edagricole (1993)

Beecken W. D., Engl T., Hofmann J., Jonas D. & Blaheta R.

Clinical relevance of serum angiogenic activity in patients with transitional cell carcinoma of the bladder.

Journal of Cellular and Molecular Medicine, 9(3), 655-661. (2005)

Bergers G., Brekken R., McMahon G., Vu T. H., Itoh T., Tamaki K., Tanzawa K., Thorpe P., Itohara S. Werb Z. & Hanahan D.

Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis.

Nature Cell Biology, 2(10), 737-744. (2000)

Bianco F.J., Gervasi D.C., Tiguert R., Grignon D.J., Pontes J.E., Crissman J.D., Fridman R. & Wood D.P.

Matrix metalloproteinase-9 expression in bladder washes from bladder cancer patients predicts pathological stage and grade.

Clinical Cancer Research, 4(12), 3011-3016. (1998)

Biller B.

Metronomic chemotherapy in veterinary patients with cancer: rethinking the targets and strategies of chemotherapy.

Veterinary Clinics: Small Animal Practice, 44(5), 817-829. (2014)

Bolanos-Garcia V. M.

MET meet adaptors: functional and structural implications in downstream signalling mediated by the Met receptor.

Molecular and Cellular Biochemistry, 276(1-2), 149-157. (2005)

Boria P.A., Glickman N.W., Schmidt B.R., Widmer W.R., Mutsaers A.J., Adams L.G., Snyder P.W., Di Bernardi L., De Gortari A.E., Bonney P.L. & Knapp D.W.

Carboplatin and piroxicam therapy in 31 dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder.

Veterinary and Comparative Oncology 3, 73–80. (2005)

Boulalas I., Zaravinos A., Delakas D., Spandidos D.A.

Mutational analysis of the BRAF gene in transitional cell carcinoma of the bladder.

International Journal of Biological Markers. 24(1):17-21. (2009)

Brodie A., Jelovac D., Sabnis G., Long B., Macedo L. & Goloubeva O.

Model systems: mechanisms involved in the loss of sensitivity to letrozole.

The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 95(1-5), 41-48. (2005)

Budreckis D.M., Byrne B.A., Pollard R.E., Rebhun R.B., Rodriguez C.O. & Skorupski K.A.

Bacterial urinary tract infections associated with transitional cell carcinoma in dogs.

Journal of Veterinary Internal Medicine, 29(3), 828-833. (2015)

Burotto M., Chiou V.L., Lee J.M. & Kohn E.C.

The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective.

Cancer, 120(22), 3446-3456. (2014)

Burrell K. & Zadeh G.

Molecular Mechanisms of Tumor Angiogenesis

Tumor Angiogenesis, Dr. Sophia Ran (Ed.) (2012)

Campos M., Ducatelle R., Kooistra H. S., Rutteman G., Duchateau L., Polis I. & Daminet S.

Immunohistochemical expression of potential therapeutic targets in canine thyroid carcinoma.

Journal of Veterinary Internal Medicine, 28(2), 564-570. (2014)

Canavese M., Ngo D., Maddern G. J., Hardingham J.E., Price T.J. & Hauben E.

Biology and therapeutic implications of VEGF-A splice isoforms and single-nucleotide polymorphisms in colorectal cancer.

International Journal of Cancer, 140(10), 2183-2191. (2017)

Cannon C.M. & Allstadt S.D.

Lower urinary tract cancer

Veterinary Clinic of Small Animals 45, 807-824. (2015)

Cerf D.J. & Lindquist E.C.

Palliative ultrasound-guided endoscopic diode laser ablation of transitional cell carcinomas of the lower urinary tract in dogs.

Journal of the American Veterinary Medical Association, 240(1), 51-60. (2012)

Chabannes E., Bernardini S., Wallerand H. & Bittard H.

Angiogenesis in bladder: prognosis indicator and therapeutic target.

Progres en urologie: journal de l'Association francaise d'urologie et de la Societe francaise d'urologie, 11(3), 417-427. (2001)

Chabottaux V. & Noel A.

Breast cancer progression: insights into multifaceted matrix metalloproteinases.

Clinical & Experimental Metastasis, 24(8), 647-656. (2007)

Cheng D., Liang B. & Li Y.

Clinical value of vascular endothelial growth factor and endostatin in urine for diagnosis of bladder cancer.

Tumori, 98(6), 762-767. (2012)

Childress M.O., Adams L.G., Ramos-Vara J.A., Freeman L.J., He S., Constable P.D. & Knapp D.W.

Results of biopsy via transurethral cystoscopy and cystotomy for diagnosis of transitional cell carcinoma of the urinary bladder and urethra in dogs: 92 cases (2003–2008).

Journal of the American Veterinary Medical Association, 239(3), 350-356. (2011)

Choy K. & Fidel J.

Tolerability And Tumor Response Of A Novel Low-dose Palliative Radiation Therapy Protocol In Dogs With Transitional Cell Carcinoma Of The Bladder And Urethra.

Veterinary Radiology & Ultrasound, 57(3), 341-351. (2016)

Chun R., Knapp D.W., Widmer W.R., De Nicola D.B., Glickman N.W., Kuczek T., De Gortari A.E. & Han C.M.

Phase II clinical trial of carboplatin in canine transitional cell carcinoma of the urinary bladder.

Journal of Veterinary Internal Medicine 654 (11), 279–283. (1997)

Chun R., Knapp D.W., Widmer W.R., Glickman N.W., De Nicola D.B. & Bonney P.L.

Cisplatin treatment of transitional cell carcinoma of the urinary bladder in dogs: 18 cases (1983-1993).

Journal of the American Veterinary Medical Association, 209(9), 1588-1591. (1996)

Cicchelero L., Denies S., Vanderperren K., Stock E., Van Brantegem L., De Rooster H. & Sanders N.N.

Immunological, anti-angiogenic and clinical effects of intratumoral interleukin 12 electrogene therapy combined with metronomic cyclophosphamide in dogs with spontaneous cancer: A pilot study.

Cancer Letters, 400, 205-218. (2017)

Cieplak P. & Strongin A. Y.

Matrix metalloproteinases—From the cleavage data to the prediction tools and beyond.

Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. Volume 1864, Issue 11, Part A, p.1952-1963 (2017)

Clifford C. A., Hughes D., Beal M. W., Mackin A. J., Henry C. J., Shofer F. S. & Sorenmo K. U.

Plasma vascular endothelial growth factor concentrations in healthy dogs and dogs with hemangiosarcoma.

Journal of Veterinary Internal Medicine, 15(2), 131-135. (2001)

Clifford C.A., Hughes D., Beal M.W., Henry C.J., Drobatz K.J. & Sorenmo K.U.

Vascular endothelial growth factor concentrations in body cavity effusions in dogs.

Journal of Veterinary Internal Medicine, 16(2), 164-168. (2002)

Crew J. P.

Vascular endothelial growth factor: an important angiogenic mediator in bladder cancer.

European Urology, 35(1), 2-8. (1999)

**Davies H., Bignell G. R., Cox C., Stephens P., Edkins S., Clegg S., .
& Davis N.**

Mutations of the BRAF gene in human cancer.

Nature, 417(6892), 949. (2002)

**Decker B, Parker HG, Dhawan D, Kwon EM, Karlins E, Davis
BW, Ramos-Vara JA, Bonney PL, McNiel EA, Knapp DW,
Ostrander EA.**

Homologous Mutation to Human BRAF V600E Is Common in Naturally Occurring Canine Bladder Cancer--Evidence for a Relevant Model System and Urine-Based Diagnostic Test.

Molecular Cancer Research.13(6):993-1002 (2015)

**Denies S., Cicchelerio L., De Rooster H., Daminet S., Polis I., Van
de Maele I. & Sanders N. N.**

Immunological and angiogenic markers during metronomic temozolomide and cyclophosphamide in canine cancer patients.

Veterinary and Comparative Oncology, 15(2), 594-605. (2017)

de Queiroz G. F., Dagli M. L. Z., Fukumasu H., Zavala A. A. Z. & Matera J. M.

Vascular endothelial growth factor expression and microvascular density in soft tissue sarcomas in dogs.

Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 22(1), 105-108.(2010)

DeVita, V. T., Lawrence, T. S., & Rosenberg, S. A.

Cancer of the Skin: Cancer: Principles & Practice of Oncology.

Edizione decima, Lippincott Williams & Wilkins (2015)

Di Carlo A., Terracciano D., Mariano A. & Macchia V.

Urinary gelatinase activities (matrix metalloproteinases 2 and 9) in human bladder tumors.

Oncology Reports, 15(5), 1321-1326. (2006)

Drake C. J.

Embryonic and adult vasculogenesis.

Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews, 69(1), 73-82. (2003)

Dvorak H. F., Brown L. F., Detmar M. & Dvorak A. M.

Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis.

The American Journal of Pathology, 146(5), 1029. (1995)

Edwards M. D., Pazzi K. A., Gumerlock P. H. & Madewell B. R.

cN-ras is activated infrequently in canine malignant lymphoma.

Toxicologic Pathology, 21(3), 288-291 (1993).

ElMaghawry M., Zanatta A. & Zampieri F.

The discovery of pulmonary circulation: From Imhotep to William Harvey.

Global Cardiology Science and Practice, 31. (2014)

English W.R., Lunt S.J., Fisher M., Lefley D.V., Dhingra M., Lee Y.C., Bingham K., Hurrell J.E., Lyons S.K., Kanthou C. & Tozer G.M.

Differential Expression of VEGFA Isoforms Regulates Metastasis and Response to Anti-VEGFA Therapy in Sarcoma.

Cancer Research, 77(10), 2633-2646. (2017)

Falini B., Martelli M. P. & Tiacci E.

BRAF V600E mutation in hairy cell leukemia: from bench to bedside.

Blood, 128(15), 1918-1927. (2016)

Ferrara N.

Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor.

Journal of Molecular Medicine, 77(7), 527-543. (1999)

Ferrara N.

Vascular endothelial growth factor.

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 29(6), 789-791. (2009)

Ferrara N.

Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy.

The Oncologist, 9(Supplement 1), 2-10. (2004)

Ferrara N.

VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors.

Nature Reviews Cancer, 2(10), 795-803. (2002)

Ferrara N.

VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth

European Cytokine Network, 20 (4). (2009)

Ferrara N. & Davis-Smyth T.

The biology of vascular endothelial growth factor.

Endocrine Reviews, 18(1), 4-25. (1997)

Ferrara N., Gerber H.P & LeCouter J.

The biology of VEGF and its receptors.

Nature Medicine, 9(6), 669-676. (2003)

Ferrara N. & Henzel W.J.

Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells

Biochemical and Biophysical Research Communications 161(3), p.851-858 (1989)

Finotello R., Henriques J., Sabattini S., Stefanello D., Felisberto R., Pizzoni S., Ferrari R. & Marconato L.

A retrospective analysis of chemotherapy switch suggests improved outcome in surgically removed, biologically aggressive canine haemangiosarcoma.

Veterinary and Comparative Oncology, 15(2), 493-503. (2017)

Folkman J.

Angiogenesis

Springer US (2008)

Folkman J.

Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis.

In Seminars in Oncology (Vol. 29, No. 6, pp. 15-18). Elsevier. (2002)

Frenz M., Kaup F. J. & Neumann S.

Serum vascular endothelial growth factor in dogs with haemangiosarcoma and haematoma.

Research in Veterinary Science, 97(2), 257-262. (2014)

Fuentes-Calvo I., Blázquez-Medela A.M., Eleno N., Santos E., López-Novoa J.M. & Martínez-Salgado C.

H-Ras isoform modulates extracellular matrix synthesis, proliferation, and migration in fibroblasts.

American Journal of Physiology-Cell Physiology, 302(4), C686-C697. (2011).

Fulkerson C.M. & Knapp D.W.

Management of transitional cell carcinoma of the urinary bladder in dogs: A review

The Veterinary Journal 205, 217-225. (2015)

Gasparini G. & Longo R.

VEGF e angiogenesi tumorale - Le prospettive della terapia antiangiogenica

Il Pensiero Scientifico editore (2005)

Gasparini G.

Clinical significance of determination of surrogate markers of angiogenesis in breast cancer.

Critical Reviews in Oncology/Hematology, 37(2), 97-114. (2001)

Gebhard C., Fuchs-Baumgartinger A., Razzazi-Fazeli E., Miller I. & Walter I.

Distribution and activity levels of matrix metalloproteinase 2 and 9 in canine and feline osteosarcoma.

Canadian Journal of Veterinary Research, 80(1), 66-73. (2016)

Gentilini F., Calzolari C., Turba M. E., Agnoli C., Fava D., Forni M. & Bergamini P. F.

Prognostic value of serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and plasma activity of matrix metalloproteinase (MMP) 2 and 9 in lymphoma-affected dogs.

Leukemia Research, 29(11), 1263-1269. (2005)

Geissler K.J., Jung M.J., Riecken L.B., Sperka T., Cui Y., Schacke S., Merkel U., Markwart R., Rubio I., Than M.E., Breithaupt C., Peuker S., Seifert R., Kaupp U.B., Herrlich P. & Morrison H.

Regulation of Son of sevenless by the membrane-actin linker protein ezrin.

Proceedings of the National Academy of Sciences, 110(51), 20587-20592. (2013)

Gerhards S., Jung K., Koenig F., Daniltchenko D., Hauptmann S., Schnorr D. & Loening S. A.

Excretion of matrix metalloproteinases 2 and 9 in urine is associated with a high stage and grade of bladder carcinoma1.

Urology, 57(4), 675-679. (2001)

Giantin M., Aresu L., Benali S., Aricò A., Morello E. M., Martano M., Vascellari M., Castagnaro M., Lopparelli R.M., Zancanella V, Mutinelli F., Dacasto M. & Granato A.

Expression of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and vascular endothelial growth factor in canine mast cell tumours.

Journal of Comparative Pathology, 147(4), 419-429. (2012)

Gieger T.L., Nettifee-Osborne J., Hallman B., Johannes C., Clarke D., Nolan M.W. & Williams L.E.

The impact of carboplatin and toceranib phosphate on serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and metalloproteinase-9 (MMP-9) levels and survival in canine osteosarcoma.

Canadian Journal of Veterinary Research, 81(3), 199-205. (2017)

Gilbert S. J., Wotton P. R., Tarlton J. F., Duance V. C. & Bailey A. J.

Increased expression of promatrix metalloproteinase-9 and neutrophil elastase in canine dilated cardiomyopathy.

Cardiovascular Research, 34(2), 377-383. (1997)

Glybchenko P. V., Shakhpazian N. K., Ponukalin A. N. & Zakharova N. B.

Molecular markers for the diagnosis of non-muscle-invasive bladder cancer.

Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika, (5), 16-20. (2011)

Gontero P., Banisadr S., Freja B. & Brausi M.

Metastasis markers in bladder cancer: a review of the literature and clinical considerations.

European Urology, 46(3), 296-311. (2004)

Goodison S., Chang M., Dai Y., Urquidi V. & Rosser C. J.

A multi-analyte assay for the non-invasive detection of bladder cancer.

PLoS One, 7(10). (2012)

Greene S.N., Lucroy M.D., Greenberg C.B., Bonney P.L. & Knapp D.W.

Evaluation of cisplatin administered with piroxicam in dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder.

Journal of the American Veterinary Medical Association 231, 1056–1060. (2007)

Guo P., Xu L., Pan S., Brekken R.A., Yang S.T., Whitaker G.B., Nagane M., Thorpe P.E., Rosenbaum J.S., Su Hang H.J., Chen S.Y. & Cavenee W.K.

Vascular endothelial growth factor isoforms display distinct activities in promoting tumor angiogenesis at different anatomic sites.

Cancer Research, 61(23), 8569-8577. (2001)

Hamacher S., Matern S. & Roeb E.

Extracellular matrix--from basic research to clinical significance. An overview with special consideration of matrix metalloproteinases.

Deutsche Medizinische Wochenschrift (1946), 129(38), 1976-1980. (2004)

Hazzah T.N., Kass P. H., Brodsky E.M., Elpiner A.K., Silver M.L., Buote N.J. & Post G.S.

Evaluation of mitoxantrone with piroxicam as first line therapy for carcinomas of the prostate in dogs.

International Journal of Applied Research of Veterinary Medicine, 11, 16-24. (2013)

Henry C.J., Tyler J.W., McEntee M.C., Stokol T., Rogers K.S., Chun R., Garrett L.D., McCaw D.L., Higginbotham M.L., Flessland K.A. & Stokes P. K.

Evaluation of a bladder tumor antigen test as a screening test for transitional cell carcinoma of the lower urinary tract in dogs.

American Journal of Veterinary Research, 64(8), 1017-1020. (2003)

Higuchi T., Burcham G.N., Childress M.O., Rohleder J.J., Bonney P.L., Ramos-Vara J.A. & Knapp D.W.

Characterization and treatment of transitional cell carcinoma of the abdominal wall in dogs: 24 cases (1985–2010).

Journal of the American Veterinary Medical Association, 242(4), 499-506. (2013)

Hirayama K, Yokota H, Onai R, Kobayashi T, Kumata T, Kihara K, Okamoto M, Sako T, Nakade T, Izumisawa Y & Taniyama H

Detection of matrix metalloproteinases in canine mammary tumours: analysis by immunohistochemistry and zymography.

Journal of Comparative Pathology, 127(4), 249-256. (2002)

Hojilla C.V., Wood G.A. & Khokha R.

Inflammation and breast cancer. Metalloproteinases as common effectors of inflammation and extracellular matrix breakdown in breast cancer.

Breast Cancer Research, 10(2), 205. (2008)

Hyder S.M. & Stancel G.M.

Regulation of VEGF in the reproductive tract by sex-steroid hormones.

Histology and Histopathology, 15(1), 325-334. (2000)

Ibrahim M. & Richardson M.K.

Beyond organoids: In vitro vasculogenesis and angiogenesis using cells from mammals and zebrafish,

Reproductive Toxicology (2017)

Jabłońska-Trypuć A., Matejczy, M. & Rosochacki S.

Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs.

Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 31, 177-183. (2016)

Jeon S. H., Lee S. J. & Chang S. G.

Clinical significance of urinary vascular endothelial growth factor in patients with superficial bladder tumors.

Oncology Reports, 8(6), 1265-1267. (2001)

Jin K., Zhu Y., Sun Y., Mao X.O., Xie L. & Greenberg, D.A.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo.

Proceedings of the National Academy of Sciences, 99(18), 11946-11950. (2002)

Jinesh G.G., Sambandam V., Vijayaraghavan S., Balaji K. & Mukherjee S.

Molecular genetics and cellular events of K-Ras-driven tumorigenesis.

Oncogene, 37(7), 839. (2018)

Johansson C.H., & Brage S.E.

BRAF inhibitors in cancer therapy.

Pharmacology & Therapeutics, 142(2), 176-182. (2014)

Joško J. & Mazurek M.

Transcription factors having impact on vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression in angiogenesis.

Medical Science Monitor, 10(4), 89-98. (2004)

Kawai K., Uetsuka K., Doi K. & Nakayama H.

The activity of matrix metalloproteinases (MMPS) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in mammary tumors of dogs and rats.

Journal of Veterinary Medical Science, 68(2), 105-111. (2006)

Khan I. A., Daya S. K. & Gowda R. M.

Evolution of the theory of circulation.

International Journal of Cardiology, 98(3), 519-521. (2005)

Kim I., Moon S.O., Park S.K., Chae S.W. & Koh G.Y.

Angiopoietin-1 reduces VEGF-stimulated leukocyte adhesion to endothelial cells by reducing ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin expression.

Circulation Research, 89(6), 477-479. (2001)

King S.E.

Matrix metalloproteinases: new directions toward inhibition in the fight against cancers

Future Medicine Chemistry 8(3), 297–309. (2016)

Knapp D.W. & McMillan S.K.

Tumors of the urinary system.

Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology 5th ed, Saunders. (2012)

Knapp D.W., Glickman N.W., Widmer W.R., De Nicola D.B., Adams L.G., Kuczek T., Bonney P.L., De Gortari A.E., Han C. & Glickman, L.T.

Cisplatin versus cisplatin combined with piroxicam in a canine model of human invasive urinary bladder cancer.

Cancer Chemotherapy and Pharmacology 46, 221–226. (2000)

Knapp D.W., Henry C.J., Widmer W.R., Tan K.M., Moore G.E., Ramos-Vara J.A., Lucroy M.D., Greenber C.B., Greene S.N., Abbo A.H., Alva R. & Hanson, P.D.

Randomized trial of cisplatin versus firocoxib versus cisplatin/firocoxib in dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder.

Journal of Veterinary Internal Medicine, 27(1), 126-133. (2013)

Knapp D.W., Ramos-Vara J.A., Moore G.E., Dhawan D., Bonney P.L. & Young K.E.

Urinary bladder cancer in dogs, a naturally occurring model for cancer biology and drug development.

ILAR journal, 55(1), 100-118. (2014)

Knapp D.W., Richardson R.C., Chan T.C., Bottoms G.D., Widmer W.R., DeNicola D.B., Teclaw R., Bonney P.L. & Kuczek T.

Piroxicam therapy in 34 dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder.

Journal of Veterinary Internal Medicine, 8(4), 273-278. (1994)

Kong D. H., Kim M. R., Jang J. H., Na H. J., & Lee S.

A Review of Anti-Angiogenic Targets for Monoclonal Antibody Cancer Therapy.

International Journal of Molecular Sciences, 18(8), 1786. (2017)

Konietschke U., Teske E., Jurina K. & Stockhaus C.

Palliative intralesional interleukin-2 treatment in dogs with urinary bladder and urethral carcinomas.

In Vivo, 26(6), 931-935. (2012)

Kumar V., Abbas A.K. & Aster J.C.

Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease

Elsevier Saunders, Ninth Edition (2015)

Kumari N., Agrawal U., Mishra A. K., Kumar A., Vasudeva P., Mohanty N. K. & Saxena S.

Predictive role of serum and urinary cytokines in invasion and recurrence of bladder cancer.

Tumor Biology, 39(4), 1010428317697552. (2017)

Lamanuzzi A., Saltarella I., Ferrucci A., Ria R., Ruggieri S., Racanelli V., Rao L., Annese T., Nico B., Vacca A. & Ribatti D.

Role of erythropoietin in the angiogenic activity of bone marrow endothelial cells of MGUS and multiple myeloma patients.

Oncotarget, 7(12), 14510. (2016)

Lana S. E., Ogilvie G. K., Hansen R. A., Powers B. E., Dernell W. S. & Withrow S. J.

Identification of matrix metalloproteinases in canine neoplastic tissue.

American Journal of Veterinary Research, 61(2), 111-114. (2000)

Lau D., Magill S.T., & Aghi M.

KMolecularly targeted therapies for recurrent glioblastoma: current and future targets.

Neurosurgical Focus, 37(6), E15 (2014).

Lazarous D.F., Shou M., Stiber J.A., Hodge E., Thirumurti V., Gonçalves L. & Unger E.F.

Adenoviral-mediated gene transfer induces sustained pericardial VEGF expression in dogs: effect on myocardial angiogenesis.

Cardiovascular Research, 44(2), 294-302. (1999)

Lee P.S.S. & Poh K.K.

Endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases.

World Journal of Stem Cells, 6(3), 355. (2014)

Leibman N.F., Lana S.E., Hansen R.A., Powers B.E., Fettman M.J., Withrow S.J. & Ogilvie G.K.

Identification of matrix metalloproteinases in canine cutaneous mast cell tumors.

Journal of Veterinary Internal Medicine, 14(6), 583-586. (2000)

Lenzi P., Bocci G. & Natale G.

John Hunter and the origin of the term "angiogenesis".

Angiogenesis, 19(2), 255. (2016)

Levy A.P., Levy N.S. & Goldberg M.A.

Hypoxia-inducible protein binding to vascular endothelial growth factor mRNA and its modulation by the von Hippel-Lindau protein.

Journal of Biological Chemistry, 271(41), 25492-25497. (1996)

Lewin B.

Nuclear splicing.

Genes VII. (2000)

Liekens S., De Clercq E. & Neyts J.

Angiogenesis: regulators and clinical applications

Biochemical Pharmacology 61 p. 253–270 (2001)

Liptak J.M., Brutscher S.P., Monnet E., Dernell W.S., Twedt D.C., Kazmierski K.J., Mullins M.N., Larue S.M. & Withrow S.J.

Transurethral resection in the management of urethral and prostatic neoplasia in 6 dogs.

Veterinary Surgery, 33(5), 505-516. (2004)

Liu B., Li C., Liu Z., Da, Z. & Tao Y.

Increasing extracellular matrix collagen level and MMP activity induces cyst development in polycystic kidney disease.

BMC Nephrology, 13(1), 109. (2012)

Loizzi V., Del Vecchio V., Gargano G., De Liso M., Kardashi A., Naglieri E., Resta L., Cicinelli E. & Cormio G.

Biological Pathways Involved in Tumor Angiogenesis And Bevacizumab Based Anti-Angiogenic Therapy with Special References to Ovarian Cancer

International Journal of Molecular Sciences, 18 (2017)

Longo, R., Gasparini G., Fanelli M. & Teicher B.A.

Combination of antiangiogenic therapy with other anticancer therapies: results, challenges, and open questions.

Journal of Clinical Oncology, 23(6), 1295-1311. (2005)

Lopez M., Gebbia N., Cascinu S. & Marchetti P.

Oncologia medica pratica.

3rd edition, Società Editrice Universo. (2010)

Loukas M., Tubbs R. S., Louis R. G., Pinyard J., Vaid S., & Curry B.

The cardiovascular system in the pre-Hippocratic era.

International Journal of Cardiology, 120(2), 145-149. (2007)

Loukopoulos P., Mungall B.A., Straw R.C., Thornton J.R. & Robinson W.F.

Matrix metalloproteinase-2 and- 9 involvement in canine tumors.

Veterinary Pathology, 40(4), 382-394. (2003)

Maciejczyk M., Pietrzykowska L.A., Zalewska A., Knaś M., Daniszewska I.

The Significance of Matrix Metalloproteinases in Oral Diseases

Adv Clin Exp Med, 25, 2, 383–390 (2016)

Mahecha A. M., & Wang H.

The influence of vascular endothelial growth factor-A and matrix metalloproteinase-2 and-9 in angiogenesis, metastasis, and prognosis of endometrial cancer.

OncoTargets and therapy, 10, 4617. (2017)

Mancini Danilo. Valutazione dell'attività delle metalloproteinasi 2 e 9 nelle urine e nel tessuto renale di cani normali e affetti da nefropatia, in amsdottorato (2008)

Mandara M. T., Pavone S., Mandrioli L., Bettini G., Falzone C., & Baroni M.

Matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 expression in canine and feline meningioma.

Veterinary Pathology, 46(5), 836-845. (2009)

Marconato L. & Amadori D.

Oncologia medica veterinaria e comparata

Poletto Editore (2012)

Marconato L., Ruess-Melzer K., Buchholz J., & Kaser-Hotz B.

New concepts in human oncology: is it possible to use them in veterinary medicine as well?.

Schweizer Archiv fur Tierheilkunde, 153(8), 351-360. (2011)

Marconato L., Zini E., Lindner D., Suslak-Brown L., Nelson V. & Jeglum A.K.

Toxic effects and antitumor response of gemcitabine in combination with piroxicam treatment in dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder.

Journal of the American Veterinary Medical Association 238, 1004–1010. (2011)

Marvel S. J., Séguin B., Dailey D.D. & Thamm D.H.

Clinical outcome of partial cystectomy for transitional cell carcinoma of the canine bladder.

Veterinary and Comparative Oncology. (2017)

Matiassek L.A., Platt S.R., Adams V., Scase T.J., Keys D., Miller J., Adamo F., Long S. & Matiassek K.

Ki-67 and vascular endothelial growth factor expression in intracranial meningiomas in dogs.

Journal of Veterinary Internal Medicine, 23(1), 146-151. (2009)

Masoud G.N. & Li W.

HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy.

Acta Pharmaceutica Sinica B, 5(5), 378-389. (2015)

McCredie M., Cox B. & Stewart J.H.

Smoking-related cancers in Maori and non-Maori in New Zealand, 1974-1993: fewer bladder cancers among Maori.

Asian Pac J Cancer Prev, 1(3), 221-225. (2000)

McMillan S.K., Boria P., Moore G.E., Widmer W.R., Bonney P.L. & Knapp D.W.

Antitumor effects of deracoxib treatment in 26 dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder.

Journal of the American Veterinary Medical Association, 239(8), 1084-1089. (2011)

McMillan S.K., Knapp D.W., Ramos-Vara J.A., Bonney P.L. & Adams L.G.

Outcome of urethral stent placement for management of urethral obstruction secondary to transitional cell carcinoma in dogs: 19 cases (2007–2010).

Journal of the American Veterinary Medical Association, 241(12), 1627-1632. (2012)

Mederle O., Mederle N., Bocan E. V., Ceașu R. & Raica M.

VEGF expression in dog mastocytoma.

Revista medico-chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi, 114(1), 185-188. (2010)

Mehta J.L. & Dhalla N.S.

Biochemical basis and therapeutic implications of angiogenesis.

Springer (2013)

Millanta F., Silvestri G., Vaselli C., Citi S., Pisani G., Lorenzi D. & Poli A.

The role of vascular endothelial growth factor and its receptor Flk-1/KDR in promoting tumour angiogenesis in feline and canine mammary carcinomas: a preliminary study of autocrine and paracrine loops.

Research in Veterinary Science, 81(3), 350-357. (2006)

Mittal R., Patel A.P., Debs L.H., Nguyen D., Patel K., Grati M., Mittal J., Yan D. & Chapagain P.

Intricate Functions of Matrix Metalloproteinases in Physiological and Pathological Conditions

Journal of Cellular Physiology 231, 2599-2621. (2016)

Miya K., Misumi K., Miyoshi N., Arai K., Fujiki M., Kubota C. & Sakamoto H.

Interpreting gelatinase activity in tumor tissue and serum as a prognostic marker of naturally developing canine tumors.

Journal of veterinary medical science, 67(8), 769-775. (2005)

Mochizuki H. & Breen M.

Sequence analysis of RAS and RAF mutation hot spots in canine carcinoma.

Veterinary and Comparative Oncology, 15(4), 1598-1605. (2017)

Mochizuki H., Shapiro S. G. & Breen M.

Detection of BRAF mutation in urine DNA as a molecular diagnostic for canine urothelial and prostatic carcinoma.

PloS one, 10(12), e0144170. (2015)

Mohammed M.A., Seleim M.F., Abdalla M.S., Sharada H.M. & Wahab A.H.A.

Urinary high molecular weight matrix metalloproteinases as non-invasive biomarker for detection of bladder cancer.

BMC urology, 13(1), 25. (2013)

Mohammed S.I., Craig B.A., Mutsaers A.J., Glickman N.W., Snyder P.W., De Gortari A.E. & Knapp D.W.

Effects of the cyclooxygenase inhibitor, piroxicam, in combination with chemotherapy on tumor response, apoptosis, and angiogenesis in a canine model of human invasive urinary bladder cancer.

Molecular Cancer Therapeutics 2(2), 183–188 (2003)

Molnár T. & Vajdovich P.

Clinical factors determining the efficacy of urinary bladder tumour treatments in dogs: surgery, chemotherapy or both?.

Acta Veterinaria Hungarica, 60(1), 55-68. (2012)

Monier F., Surla A., Guillot M. & Morel F.

Gelatinase isoforms in urine from bladder cancer patients.

Clinica Chimica Acta, 299(1-2), 11-23. (2000)

Moore A.S., Cardona A., Shapiro W. & Madewell B.R.

Cisplatin (cisdiamminedichloroplatinum) for treatment of transitional cell carcinoma of the urinary bladder or urethra. A retrospective study of 15 dogs.

Journal of Veterinary Internal Medicine 4, 148–152. (1990)

Moore C.S. & Crocker S.J.

An alternate perspective on the roles of TIMPs and MMPs in pathology.

The American Journal of Pathology, 180(1), 12-16. (2012)

Morfoisse F., Renaud E., Hantelys F., Prats A.C. & Garmy-Susini B.

Role of hypoxia and vascular endothelial growth factors in lymphangiogenesis.

Molecular & Cellular Oncology, 2(4). (2015)

Murakami M., Sakai H., Kodama A., Yanai T., Mori T., Maruo K. & Masegi T.

Activation of matrix metalloproteinase (MMP)-2 by membrane type 1-MMP and abnormal immunolocalization of the basement membrane components laminin and type IV collagen in canine spontaneous hemangiosarcomas.

Histology and Histopathology, 24(4), 437. (2009)

Mutsaers A.J., Widmer W.R. & Knapp D.W.

Canine transitional cell carcinoma.

Journal of Veterinary Internal Medicine, 17(2), 136-144. (2003)

Nagase H. & Woessner J. F.

Matrix metalloproteinases

Journal of Biological chemistry, 274(31), 21491-21494. (1999)

Nagase H., Visse R. & Murphy G.

Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs.

Cardiovascular Research, 69(3), 562-573. (2006)

Nakaichi M., Yunuki T., Okuda M., Une S. & Taura Y.

Activity of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in canine oronasal tumors.

Research in Veterinary Science, 82(2), 271-279. (2007)

Natale G., Bocci G. & Lenzi P.

Looking for the word “angiogenesis” in the history of health sciences: from ancient times to the first decades of the twentieth century.

World Journal of Surgery, 41(6), 1625-1634. (2017)

Newman R. G., Kitchell B. E., Wallig M. A. & Paria B.

The cloning and expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 2 in normal canine lymph nodes and in canine lymphoma.

Research in Veterinary Science, 84(2), 206-214. (2008)

Norris A.M., Laing E.J., Valli V.E., Withrow S.J., Macy D.W., Ogilvie G.K., Tomlinson J., McCaw D., Pidgeon G. & Jacobs R.M.

Canine bladder and urethral tumors: a retrospective study of 115 cases (1980–1985).

Journal of Veterinary Internal Medicine, 6(3), 145-153. (1992)

Nowak M., Madej J. A., Podhorska-Okolow M. & Dziegiel P.

Expression of extracellular matrix metalloproteinase (MMP-9), E-cadherin and proliferation-associated antigen Ki-67 and their reciprocal correlation in canine mammary adenocarcinomas.

In Vivo, 22(4), 463-469. (2008)

Nyland T.G., Wallack S.T. & Wisner E.R.

Needle-tract implantation following US-guided fine-needle aspiration biopsy of transitional cell carcinoma of the bladder, urethra, and prostate.

Veterinary Radiology & Ultrasound, 43(1), 50-53. (2002)

Overall C. M. & Kleifeld O.

Validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy.

Nature Reviews Cancer, 6(3), 227-239. (2006)

Pàez-Ribes M., Allen E., Hudock J., Takeda T., Okuyama H., Viñals F., Inoue M., Bergers G., Hanahan D. & Casanovas O.

Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis.

Cancer Cell, 15(3), 220-231. (2009)

Papageorgiou N. & Tousoulis D.

Matrix Metalloproteinases in Cardiovascular Disease

Current Topics in Medicinal Chemistry, 12 (10). (2012)

Papparella S., Restucci B., Paciello O. & Maiolino P.

Expression of matrix metalloprotease-2 (MMP-2) and the activator membrane type 1 (MT1-MMP) in canine mammary carcinomas.

Journal of Comparative Pathology, 126(4), 271-276. (2002)

Papparella S., Restucci B., Maiolino P. & De Vico G.

Immunohistochemical distribution of type IV collagenase in normal, dysplastic and neoplastic canine mammary gland.

Journal of Comparative Pathology, 117: 277–282. (1997)

Papetti M. & Herman I. M.

Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis.

American Journal of Physiology-Cell Physiology, 282(5), C947-C970.
(2002)

Pearce J.M.S.

Malpighi and the discovery of capillaries.

European Neurology, 58(4), 253-255. (2007)

Pessina P., Castillo V., Sartore I., Borrego J. & Meikle A.

Semiquantitative immunohistochemical marker staining and localization in canine thyroid carcinoma and normal thyroid gland.

Veterinary and Comparative Oncology, 14(3). (2016)

Peyssonnaud C., Rul W., Zugasti O., Roux P., Eychene A, Franke TF, Lenormand P, Fort P & Hibner U.

Activation of ERK, controlled by Rac1 and Cdc42 via Akt, is required for anoikis.

Annals of the New York Academy of Sciences, 973(1), 145-148. (2001)

Pierre S. & Coumoul X.

Understanding SOS (Son of Sevenless).

Biochemical Pharmacology, 82(9), 1049-1056. (2011)

Platt S.R., Matiasek L.A., Adams V., Scase T.J., Keys D., Miller J., Adamo F., Long S. & Matiasek K.

Ki-67 and vascular endothelial growth factor expression in intracranial meningiomas in dogs.

Journal of Veterinary Internal Medicine, 23(1), 146-151. (2009)

Poirier V.J., Forrest L.J., Adams W.M. & Vail D.M.

Piroxicam, mitoxantrone, and coarse fraction radiotherapy for the treatment of transitional cell carcinoma of the bladder in 10 dogs: a pilot study.

Journal of the American animal Hospital Association, 40(2), 131-136. (2004)

Pollard R. E., Watson K. D., Hu X., Ingham E. & Ferrara K. W.

Feasibility of quantitative contrast ultrasound imaging of bladder tumors in dogs.

The Canadian Veterinary Journal, 58(1), 70. (2017)

Pontieri G.M.

Patologia generale

Piccin editore (1996)

Prioreschi P.

Andrea Cesalpino and systemic circulation.

*In Annales Pharmaceutiques Francaises (Vol. 62, No. 6, pp. 382-400).
Elsevier Masson. (2004)*

Pulz L.H. & Strefezzi R.F.

Proteases as prognostic markers in human and canine cancers.

Veterinary and Comparative Oncology, 15(3), 669-683. (2017)

**Raghavan M., Knapp D.W., Dawson M.H., Bonney P.L. &
Glickman L.T.**

Topical flea and tick pesticides and the risk of transitional cell carcinoma of the urinary bladder in Scottish Terriers.

Journal of the American Veterinary Medical Association, 225(3), 389-394. (2004)

**Rastrelli M., Tropea S, Pigozzo J, Bezzon E, Campana LG,
Stramare R, Alaibac M & Rossi CR.**

Melanoma m1: diagnosis and therapy.

In Vivo, 28(3), 273-285. (2014)

**Ratajska A., Jankowska-Steifer E., Czarnowska E., Olkowski R.,
Gula G., Niderla-Bielińska J., Flaht-Zabost A. & Jasińska A.**

Vasculogenesis and Its Cellular Therapeutic Applications.

Cells Tissues Organs, 203(3), 141-152. (2017)

Rawlings N. G., Simko E., Bebachuk T., Caldwell S. J. & Singh B.

Localization of integrin α v β 3 and vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR/Flk-1) in cutaneous and oral melanomas of dog.

Histology and Histopathology, 18(3), 819-826. (2003)

Rebuzzi L, Willmann M, Sonneck K, Gleixner KV, Florian S, Kondo R, Mayerhofer M, Vales A, Gruze A, Pickl WF, Thalhammer JG, Valent P

Detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors Flt-1 and KDR in canine mastocytoma cells.

Veterinary Immunology and Immunopathology, 115(3-4), 320-333. (2007)

Reed L.T., Knapp D.W. & Miller M.A.

Cutaneous metastasis of transitional cell carcinoma in 12 dogs.

Veterinary Pathology, 50(4), 676-681. (2013)

Reid C. N., Stevenson M., Abogunrin F., Ruddock M. W., Emmert-Streib F., Lamont J. V. & Williamson K. E.

Standardization of diagnostic biomarker concentrations in urine: the hematuria caveat.

PLoS One, 7(12), e53354. (2012)

Remacle A.G., Rozanov D.V., Baciuc P.C., Chekanov A.V., Golubkov V.S. & Strongin A.Y.

The transmembrane domain is essential for the microtubular trafficking of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP).

Journal of Cell Science, 118(21), 4975-4984. (2005)

Restucci, B., Martano, M., Ceccarelli, D. M., Lo Muzio, L., & Maiolino, P.

Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor in canine oral squamous cell carcinomas.

Oncology Letters, 11(1), 399-404. (2016)

Ribatti D.

Chapter 2.

In: History of Research on Tumor Angiogenesis (p.20-24) Springer, US (2009)

Ribatti D.

Judha Folkman, a pioneer in the study of angiogenesis

Angiogenesis 11(1) p 3-10 (2008)

Ribatti D.

The Discovery of Tumor Angiogenesis Factors: A Historical Overview.

Tumor Angiogenesis Assays: Methods and Protocols, 1-12. (2016)

Ribatti D.

The Role of Microenvironment in the Control of Tumor Angiogenesis
Springer (2016)

Ribatti D., Vacca A., & Dammacco F.

The role of the vascular phase in solid tumor growth: a historical review.

Neoplasia, 1(4), 293-302. (1999)

Rippy S.B., Gardner H.L., Nguyen S.M., Warry E.E., Portela R.F., Drost W.T., Hostnik E.T., Green E.M., Chew D.J., Peng J. & London C.A.

A pilot study of toceranib/vinblastine therapy for canine transitional cell carcinoma.

BMC veterinary research, 12(1), 257. (2016)

Robat C., Burton J., Thamm D. & Vail D.

Retrospective evaluation of doxorubicin-piroxicam combination for the treatment of transitional cell carcinoma in dogs.

The Journal of Small Animal Practice 54, 67–74. (2013)

Robinson C. J. & Stringer S. E.

The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors.

Journal of Cell Science, 114(5), 853-865. (2001)

Roskoski Jr R.

ErbB/HER protein-tyrosine kinases: Structures and small molecule inhibitors.

Pharmacological Research, 87, 42-59. (2014)

Roskoski Jr R.

RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation.

Biochemical and Biophysical Research Communications, 399(3), 313-317. (2010)

Rosser C. J., Ross S., Chang M., Dai Y., Mengual L., Zhang G., Kim J., Urquidi V., Alcaraz A. & Goodison S.

Multiplex protein signature for the detection of bladder cancer in voided urine samples.

The Journal of Urology, 190(6), 2257-2262. (2013)

Ruokolainen H., Pääkkö P. & Turpeenniemi-Hujanen T.

Serum matrix metalloproteinase-9 in head and neck squamous cell carcinomas is a prognostic marker.

International Journal of Cancer, 116(3), 422-427. (2005)

Santos A., Lopes C., Gärtner F. & Matos A.J.F.

VEGFR-2 expression in malignant tumours of the canine mammary gland: a prospective survival study.

Veterinary and Comparative Oncology, 14(3). (2016)

Santos A. A., Lopes C. C., Marques R. M., Amorim I. F., Gärtner M. F. & de Matos A. J.

Matrix metalloproteinase-9 expression in mammary gland tumors in dogs and its relationship with prognostic factors and patient outcome.

American Journal of Veterinary Research, 73(5), 689-697. (2012)

Santos A.A.F., Oliveira J.T., Lopes C.C.C., Amorim I.F., Vicente C.M.F.B., Gärtner F.R.M. & Matos A.J.F.

Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumours.

Journal of Comparative Pathology, 143(4), 268-275. (2010)

Scher H.I. & Motzer R.J.

Bladder and renal cell carcinomas.

Harrison's principles of Internal Medicine. 17th Edition. McGraw Hills Publications (2012)

Schrempp D.R., Childress M.O., Stewart J.C., Leach T.N., Tan K.M., Abbo A.H., De Gortari A.E., Bonney P.L. & Knapp D.W.

Metronomic administration of chlorambucil for treatment of dogs with urinary bladder transitional cell carcinoma.

Journal of the American Veterinary Medical Association, 242(11), 1534-1538. (2013)

Shoji M., Abe K., Chen J., Bierhaus A., Danave I., Micko C. & Rickles F.R.

Regulation of vascular endothelial growth factor production and angiogenesis by the cytoplasmic tail of tissue factor.

Proceedings of the National Academy of Sciences, 96(15), 8663-8668. (1999)

Sier C. F., Casetta G., Verheijen J. H., Tizzani A., Agape V., Kos J., Blasi F. & Hanemaaijer R.

Enhanced urinary gelatinase activities (matrix metalloproteinases 2 and 9) are associated with early-stage bladder carcinoma: a comparison with clinically used tumor markers.

Clinical Cancer Research, 6(6), 2333-2340. (2000)

Simons M., Gordon E. & Claesson-Welsh L.

Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling.

Nature Reviews Molecular Cell Biology, 17(10), 611-625. (2016)

Sledge D.G., Patrick D.J., Fitzgerald S.D., Xie Y. & Kiupel M.

Differences in expression of uroplakin III, cytokeratin 7, and cyclooxygenase-2 in canine proliferative urothelial lesions of the urinary bladder.

Veterinary Pathology, 52(1), 74-82. (2015)

Sobczyńska-Rak A., Polkowska I. & Silmanowicz, P.

Elevated Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) levels in the blood serum of dogs with malignant neoplasms of the oral cavity.

Acta Veterinaria Hungarica, 62(3), 362-371. (2014)

Stenman A., Welander J., Gustavsson I., Brunaud L., Bäckdahl M., Söderkvist P., ... & Larsson C.

HRAS mutation prevalence and associated expression patterns in pheochromocytoma.

Genes, Chromosomes and Cancer, 55(5), 452-459. (2016).

Sternlicht M. D. & Werb Z.

How matrix metalloproteinases regulate cell behavior.

Annual Review of Cell and Developmental Biology, 17(1), 463-516. (2001)

Sullivan R. J. & Flaherty K. T.

Resistance to BRAF-targeted therapy in melanoma.

European Journal of Cancer, 49(6), 1297-1304. (2013)

Sun Y., Tu Y., He L.I., Ji C. & Cheng B.O.

High mobility group box 1 regulates tumor metastasis in cutaneous squamous cell carcinoma via the PI3K/AKT and MAPK signaling pathways.

Oncology Letters, 11(1), 59-62. (2016)

Takagi S., Kato Y., Asano K., Ohsaki T., Bosnakovski D., Hoshino Y., Okumura M., Kadosawa T. & Fujinaga, T.

Matrix metalloproteinase inhibitor RECK expression in canine tumors.

Journal of Veterinary Medical Science, 67(8), 761-767. (2005)

Theodoropoulos V.E., Lazaris A.C., Sofras F., Gerzelis I., Tsoukala V., Ghikonti I., Manikas K. & Kastriotis I.

Hypoxia-inducible factor 1 α expression correlates with angiogenesis and unfavorable prognosis in bladder cancer.

European Urology, 46(2), 200-208. (2004)

Trexler M., Briknarová K., Gehrmann M., Llinás M. & Patthy L.

Peptide ligands for the fibronectin type II modules of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2).

Journal of Biological Chemistry, 278(14), 12241-12246. (2003)

Troy G.C., Huckle W.R., Rossmeisl J.H., Panciera D., Lanz O., Robertson J.L., & Ward D.L.

Endostatin and Vascular Endothelial Growth Factor Concentrations in Healthy Dogs, Dogs with Selected Neoplasia, and Dogs with Nonneoplastic Diseases

Journal of Veterinary Internal Medicine 20(1), 144–150. (2006)

Turba M.E., Forni M., Gandini G. & Gentilini F.

Recruited leukocytes and local synthesis account for increased matrix metalloproteinase-9 activity in cerebrospinal fluid of dogs with central nervous system neoplasm.

Journal of NeuroOncology, 81(2), 123-129. (2007)

Vargesson N.

Thalidomide-induced teratogenesis: History and mechanisms.

Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology, 105(2), p.140-156. (2015)

Veikkola T. & Alitalo K.

VEGFs, receptors and angiogenesis.

In Seminars in Cancer Biology (Vol. 9, No. 3, pp. 211-220) (1999)

Vignoli M., Rossi F., Chierici C., Terragni R., De Lorenzi D., Stanga M. & Olivero D.

Needle tract implantation after fine needle aspiration biopsy (FNAB) of transitional cell carcinoma of the urinary bladder and adenocarcinoma of the lung.

Schweizer Archiv fur Tierheilkunde, 149(7), 314-318. (2007)

Urquidi V., Goodison S., Kim J., Chang M., Dai Y. & Rosser C. J.

Vascular endothelial growth factor, carbonic anhydrase 9, and angiogenin as urinary biomarkers for bladder cancer detection.

Urology, 79(5), 1185-e1. (2012)

Wang Z., Juttermann R. & Soloway P. D.

TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo.

Journal of Biological Chemistry, 275(34), 26411-26415. (2000)

Weiss L.

Early concepts of cancer.

Cancer and Metastasis Reviews, 19(3-4), 205-217. (2000)

Willerson J. T. & Teaff R.

Egyptian contributions to cardiovascular medicine.

Texas Heart Institute Journal, 23(3), 191. (1996)

Withrow S.J., Vail D.M. & Page R.L.

Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology.

Saunders Elvisier (2012)

Wolfesberger, B., De Arespacohaga, A. G., Willmann, M., Gerner W, Miller I, Schwendenwein I, Kleiter M, Egerbacher M, Thalhammer JG, Muellauer L, Skalicky M & Walter I.

Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in canine lymphoma.

Journal of Comparative Pathology, 137(1), 30-40. (2007)

Wongsetthachai P., Pramatinai C., Banlunara W. & Kalpravidh M.

Urinary bladder wall substitution using autologous tunica vaginalis in male dogs.

Research in Veterinary Science, 90(1), 156-159. (2011)

Yadav L., Puri N., Rastogi V., Satpute P., Ahmad R. & Kaur G.

Matrix metalloproteinases and cancer-roles in threat and therapy.

Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 15(3), 1085-91. (2014)

Yonemaru K., Sakai H., Murakami M., Yanai T. & Masegi T.

Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and their receptors (flt-1, flk-1, and flg-1) in canine vascular tumors.

Veterinary Pathology, 43(6), 971-980. (2006)

Yoon S.O., Park S.J., Yun C.H. & Chung A.S.

Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis.

Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 36(1), 128-137. (2003)

Zaravinos A., Chatziioannou M., Lambrou G. I., Boulalas I., Delakas D. & Spandidos D. A.

Implication of RAF and RKIP genes in urinary bladder cancer.

Pathology & Oncology Research, 17(2), 181-190. (2011)

Zhang Y., Frimberger D., Cheng E.Y., Lin H.K. & Kropp B.P.

Challenges in a larger bladder replacement with cell-seeded and unseeded small intestinal submucosa grafts in a subtotal cystectomy model.

BJU international, 98(5), 1100-1105. (2006)

Zhu J. Y., Sun Q. K., Wang W. & Jia W. D.

High-level expression of HOXB13 is closely associated with tumor angiogenesis and poor prognosis of hepatocellular carcinoma.

International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 7(6), 2925. (2014)

Zorzan E., Hanssens K., Giantin M., Dacasto M. & Dubreuil P.

Mutational hotspot of TET2, IDH1, IDH2, SRSF2, SF3B1, KRAS, and NRAS from human systemic mastocytosis are not conserved in canine mast cell tumors.

PloS one, 10(11), e0142450. (2015)